

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



ANALISIS DE RESISTENCIAS A ANTIMICROBIANOS EN AISLADOS DE
ESCHERICHIA COLI PROCEDENTES DE CERDOS TRATADOS POR VIA
ORAL CON DIFERENTES DOSIS DE COLISTINA

TESIS DOCTORAL DE:

SONIA JURADO RABADÁN

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**JOSÉ ANTONIO RUIZ SANTA QUITERIA SERRANO DE LA CRUZ
RICARDO DE LA FUENTE LÓPEZ**

Madrid, 2013

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal



Tesis Doctoral

Análisis de resistencias a antimicrobianos en aislados de *Escherichia coli* procedentes de cerdos tratados por vía oral con diferentes dosis de colistina

Sonia Jurado Rabadán

Madrid, 2012

Memoria presentada por Dña. Sonia Jurado Rabadán para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Directores de la Tesis Doctoral

Dr. José Antonio Ruiz Santa Quiteria Serrano de la Cruz

Dr. Ricardo de la Fuente López



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal

José Antonio Ruiz Santa Quiteria Serrano de la Cruz y Ricardo de la Fuente López, Profesor Titular y Catedrático, respectivamente, del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Análisis de resistencias a antimicrobianos en aislados de *Escherichia coli* procedentes de cerdos tratados por vía oral con diferentes dosis de colistina”**, que presenta la Licenciada en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid Dña. Sonia Jurado Rabadán para optar al título de Doctora por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense.

Y para que así conste, a todos los efectos, firmamos la presente en Madrid, a 10 de Octubre del 2012.

Fdo. : José Antonio Ruiz Santa Quiteria

Fdo.: Ricardo de la Fuente López

Con todo mi cariño,
a mis padres y a mis abuelos

AGRADECIMIENTOS

Nunca pensé que pudiera llegar a esta recta final después de tantos años de trabajo, de esfuerzo, de intentar hacer malabarismos para organizar el poco tiempo libre que mi trabajo como clínico veterinario me dejaba para terminar la escritura de esta Tesis. Sin embargo, al final, me encuentro aquí, terminando esta etapa de mi vida que, más allá de lo puramente científico, me ha enseñado muchas cosas, me ha hecho crecer como persona, superar mis miedos, ser consciente de que ninguna meta es inalcanzable si de verdad quieres llegar a ella y que, además, me ha permitido trabajar con gente maravillosa. No obstante, se que no habría llegado a este punto sin el apoyo de muchas personas a las que hoy, con todo mi cariño, debo dar las gracias.

Al Dr. José Antonio Ruiz Santa Quiteria, “Santa”, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este trabajo, por dirigirme, por esas horas a mi lado en el laboratorio, frente al ordenador o donde te necesitara y por quitarme el miedo a los números y enseñarme a disfrutar de mis resultados en lugar de verlos como un problema.

Al Dr. Ricardo de la Fuente López, porque confiaste en mí desde el principio, me permitiste formar parte de tu grupo de investigación y me has ayudado enormemente en estos años con tus correcciones y con tu apoyo moral en los momentos en los que quise abandonar este proyecto que ahora termina.

Al Dr. Ignacio Badiola y a Ana Pérez de Rozas del CReSA, por haber llevado a cabo la parte experimental de este estudio y obtener el cepario sin el que este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dr. Yvonne Agersø y al Dr. Frank Møller Aarestrup, por permitirme realizar una estancia en el *National Food Institute*, de la Universidad Técnica de Dinamarca formando parte de su grupo de investigación. Trabajar con todos vosotros durante esos tres meses fue todo un honor y un privilegio.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por haberme financiado con una beca FPI mis años de trabajo de investigación y mi estancia en Dinamarca.

A Miguel Ángel Moreno, Karmele Colom, Carmen Torres, F.M. Aarestrup y Patrice Courvalin por cederme cepas control para las PCR realizadas a lo largo de este estudio.

A mi familia, especialmente a mis abuelos, por vuestro amor incondicional que me acompaña desde niña, y a mis padres, Loli y Antonio, por haberme ayudado moral y económicamente, primero a alcanzar mi sueño de ser Veterinaria y luego a lograr el objetivo de ver acabada esta Tesis Doctoral. Nadie como vosotros sabe cuántas barreras he tenido que superar para llegar hasta aquí.

A Forteza, por estar siempre a mi lado, por rescatarme del laboratorio a horas intempestivas, por quererme, entenderme, apoyarme y arrancarme una sonrisa aun en los peores momentos. Sin tus “So, tu puedes” está tesis, que también es tuya, jamás se habría visto acabada.

A mi amiga Nuria, que aunque siempre me ha dicho que no entendía muy bien para qué demonios estaba haciendo todo esto, siempre me ha apoyado, me ha acogido y me ha escuchado cuando lo he necesitado.

A Óscar, por ser paciente conmigo y aguantarme en la recta final de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio y del Departamento de Sanidad Animal: Toño, María, Carmen, Susana, Gustavo, Pilar, Aldara, Chris, Mauricio, Sabrina, Belén, Rocío, Elena, Lara y Javi. Por ayudarme en mi trabajo y por aguantar mis días negros durante todos estos años.

A Alberto, porque empezaste siendo un compañero de trabajo y ahora eres mi amigo. Porque nadie como tu entendía mis frustraciones con las PCR, con los resultados, con la escritura....Por tu apoyo inigualable y tu cariño. Un pedacito de mi corazón se ha ido contigo a Venezuela.

A Almirita, por los buenos momentos en el laboratorio, por los cafés para recargar pilas, por las confidencias y por darme tu apoyo y tu cariño. Otro pedacito de mi corazón está contigo en Londres.

A mis compañeros del laboratorio del *National Food Institute* de la *Technical University of Denmark*, Copenhague: Lina, Lourdes, Louise, Lisbeth...y en especial a Antonio, por ayudarme tanto en aquellos tres meses y por tu amistad que aún hoy en día conservo.

A Reyes, nuestra secretaria del Departamento, por estar dispuesta siempre a resolver mis dudas administrativas y atenderme siempre con una sonrisa.

A Eva, que además de mantener impecable el laboratorio me daba conversación y hacía que me olvidara, aunque solo fuera unos minutos, de las PCRs que no salían.

A mi perrita Amira (cuanto te extraño) y a mi numerosa familia gatuna, porque habéis aguantado estoicamente mis achuchones y abrazos cuando lo he necesitado, porque habéis estado en mi regazo miles de veces mientras escribía esta Tesis y porque sin vosotros mi vida sería muy aburrida.

Y en general, a todos aquellos que durante estos años, en un momento u otro, me han dicho “ánimo” y no han permitido que abandonara este proyecto.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
LISTADO DE TABLAS.....	IX
LISTADO DE FIGURAS.....	XI
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN.....	XVII
SUMMARY	XXI

1 .INTRODUCCIÓN 1

1.1. USO DE ANTIMICROBIANOS EN ANIMALES DE PRODUCCIÓN Y POSIBLES IMPLICACIONES EN LAS RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS EN MEDICINA HUMANA	3
1.2. <i>Escherichia coli</i> Y SU IMPORTANCIA EN EL ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS	8
1.3. RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS: CÓMO LAS BACTERIAS HAN LOGRADO GANAR LA BATALLA A LOS ANTIMICROBIANOS	11
1.3.1. Generalidades	11
1.3.2. Elementos genéticos implicados en la transmisión de resistencias antimicrobianas	13
1.3.2.1. Plásmidos.....	13
1.3.2.2. Transposones.....	14
1.3.2.3. Integrones.....	16
1.4. MECANISMOS DE ACCIÓN Y DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	17

1.4.1. ANTIMICROBIANOS POLIPEPTÍDICOS: POLIMIXINA E O COLISTINA	17
1.4.2. ANTIMICROBIANOS β -LACTÁMICOS: AMOXICILINA	21
1.4.3. TETRACICLINAS: DOXICICLINA.....	25
1.4.4. AMINOGLUCÓSIDOS: GENTAMICINA.....	27
1.4.5. QUINOLONAS: ENROFLOXACINA	31
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1. DESARROLLO DEL ENSAYO EXPERIMENTAL REALIZADO CON CERDOS TRATADOS POR VÍA ORAL CON DIFERENTES DOSIS DE COLISTINA	45
3.2. TOMA DE MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO BACTERIANO	45
3.3. PROCESADO DE LAS MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO BACTERIANO.....	46
3.4. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA	46
3.5. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA.....	47
3.5.1. Extracción de ADN	47
3.5.2. Detección de genes de resistencia a tetraciclinas	48
3.5.2.1. Muestreo de aislados y genes de resistencia a tetraciclinas analizados	48
3.5.2.2. Reacción de PCR y oligonucleótidos empleados	48
3.5.3. Detección de genes de resistencia a β -lactámicos	51

3.5.3.1. Muestreo de aislados y genes de resistencia a β -lactámicos analizados	51
3.5.3.2. Reacción de PCR y oligonucleótidos empleados	51
3.5.4. Detección de genes de resistencia a aminoglucósidos.....	53
3.5.4.1. Muestreo de aislados y genes de resistencia a aminoglucósidos analizados	53
3.5.4.2. Reacción de PCR y oligonucleótidos empleados	53
3.5.5. Amplificación de la región QRDR de los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i>	54
3.5.5.1. Aislados incluidos en el estudio.....	55
3.5.5.2. Reacción de PCR y oligonucleótidos empleados	55
3.5.5.3. Purificación y secuenciación de los productos de amplificación de la región QRDR de los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i> obtenidos por PCR para determinar la presencia de mutaciones.....	56
3.6. ESTUDIO DE LOS PERFILES GENOTÍPICOS Y ANÁLISIS DE LA RELACIÓN CLONAL EXISTENTE ENTRE LOS AISLADOS DE <i>E. coli</i>	56
3.6.2. Extracción de ADN	56
3.6.3. Reacción de REP-PCR y oligonucleótidos empleados	57
3.6.5. Análisis de los perfiles genotípicos obtenidos por REP-PCR.....	58
3.7. ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL GEN <i>tet(M)</i> DETECTADO EN LOS AISLADOS DE <i>E. coli</i> PROCEDENTES DE CERDOS TRATADOS CON COLISTINA	59
3.7.1. Aislados bacterianos incluidos en el estudio	59
3.7.2. Detección de los transposones Tn916, Tn5397 y Tn5801	59
3.7.2.1. Extracción de ADN	60
3.7.2.2. Reacción de PCR y oligonucleótidos empleados	60
3.7.3. Estudio de la posible transferencia por conjugación del gen <i>tet(M)</i> a través de la técnica de <i>filter mating</i>	62
3.7.3.1 Ensayo de conjugación entre aislados de enterococos.....	62
3.7.3.1.1 Aislados bacterianos empleados.....	62
3.7.3.1.2. Protocolo utilizado para llevar a cabo la conjugación bacteriana.....	63
3.7.3.1.3. Cálculo del límite de detección	65

3.7.3.1.4. Identificación por PCR del gen <i>tet</i> (M) en los transconjugantes obtenidos.....	65
3.7.3.2. Ensayo de conjugación empleando aislados de <i>E. coli</i> como donadores y aislados de enterococos como receptores	65
3.7.3.2.1. Aislados bacterianos empleados.....	65
3.7.3.2.2. Protocolo utilizado para llevar a cabo la conjugación bacteriana.....	66
3.7.3.2.3. Cálculo del límite de detección	65
3.7.3.3 Ensayo de conjugación empleando aislados de enterococos como donadores y aislados de <i>E. coli</i> como receptores.	67
3.7.3.3.1. Aislados bacterianos empleados.....	67
3.7.3.3.2. Protocolo utilizado para llevar a cabo la conjugación bacteriana.....	67
3.7.3.3.3. Cálculo del límite de detección	67
3.7.3.3.4. Identificación por PCR del gen <i>tet</i> (M) en los transconjugantes obtenidos.....	67
3.8 SECUENCIACIÓN Y RELACIÓN FILOGENÉTICA DEL GEN <i>tet</i> (M) DETECTADO EN LOS AISLADOS DE <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus spp.</i> PROCEDENTES DE LOS CERDOS TRATADOS CON COLISTINA	68
3.8.1 Amplificación de la secuencia completa del gen <i>tet</i> (M) por PCR.....	68
3.8.2 Análisis filogenético del gen <i>tet</i> (M)	70
3.9 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	70

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 73

4.1. AISLADOS DE <i>E. coli</i> OBTENIDOS DURANTE EL ENSAYO EXPERIMENTAL REALIZADO CON CERDOS TRATADOS POR VÍA ORAL CON DIFERENTES DOSIS DE COLISTINA.....	75
4.2 RESULTADOS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIO DE GENES DE RESISTENCIA.....	75
4.2.1 RESULTADOS DE SENSIBILIDAD A COLISTINA	75
4.2.1A Resultados de sensibilidad a colistina del total de los aislados de <i>E. coli</i>	75

4.2.1B Resultados de sensibilidad a colistina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.....	78
4.2.1C Resultados de sensibilidad a colistina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día	78
4.2.1D Resultados de sensibilidad a colistina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día	80
4.2.2 RESULTADOS DE SENSIBILIDAD A AMOXICILINA	81
4.2.2A Resultados de sensibilidad a amoxicilina del total de los aislados de <i>E. coli</i>	81
4.2.2B. Resultados de sensibilidad a amoxicilina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.....	83
4.2.2C. Resultados de sensibilidad a amoxicilina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina.....	83
4.2.2D. Resultados de sensibilidad a amoxicilina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina.....	83
4.2.2E. Detección de genes implicados en la resistencia a β -lactámicos	85
4.2.3. RESULTADOS DE SENSIBILIDAD A DOXICICLINA	86
4.2.3A. Resultados de sensibilidad a doxiciclina del total de los aislados de <i>E. coli</i>	86
4.2.3B. Resultados de sensibilidad a doxiciclina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.....	87
4.2.3C. Resultados de sensibilidad a doxiciclina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina.....	87
4.2.3D. Resultados de sensibilidad a doxiciclina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina.....	87
4.2.3E. Detección de genes implicados en la resistencia a tetraciclinas	89

4.2.4 RESULTADOS DE SENSIBILIDAD A GENTAMICINA.....	94
4.2.4A. Resultados de sensibilidad a gentamicina del total de los aislados de <i>E. coli</i>	94
4.2.4B. Resultados de sensibilidad a gentamicina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.....	94
4.2.4C. Estudio de sensibilidad a gentamicina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina.....	96
4.2.4D. Resultados de sensibilidad a gentamicina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina.....	97
4.2.4E. Detección de genes implicados en la resistencia a aminoglucósidos ...	98
4.2.5 RESULTADOS DE SENSIBILIDAD A ENROFLOXACINA	101
4.2.5A. Resultados de sensibilidad a enrofloxacin del total de los aislados de <i>E. coli</i>	101
4.2.5B. Resultados de sensibilidad a enrofloxacin de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.....	102
4.2.5C. Resultados de sensibilidad a enrofloxacin de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina.....	102
4.2.5D. Resultados de sensibilidad a enrofloxacin de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina.....	104
4.2.5E. Detección de mecanismos de resistencia a quinolonas	105
4.3. FENOTIPOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.....	109
4.3.1 Fenotipos de resistencia antimicrobiana en el total de los aislados de <i>E. coli</i>	109

4.3.2. Fenotipos de resistencia antimicrobiana de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.....	112
4.3.3. Fenotipos de resistencia antimicrobiana de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina.....	114
4.3.4. Fenotipos de resistencia antimicrobiana de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina.....	114
4.4. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LOS PERFILES GENOTÍPICOS Y ANÁLISIS DE LA RELACIÓN CLONAL EXISTENTE ENTRE LOS AISLADOS DE <i>E. coli</i>	117
4.4.1. Análisis de los perfiles genotípicos y su asociación con los fenotipos de resistencia de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de cada una de las etapas.....	118
4.4.2. Análisis de los perfiles genotípicos y su asociación con los fenotipos de resistencia de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales incluidos en los diferentes grupos de tratamiento	123
4.4.2A. Análisis de los perfiles genotípicos y su asociación con los fenotipos de resistencia de los aislados procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina	123
4.4.2B. Análisis de los perfiles genotípicos y su asociación con los fenotipos de resistencia de los aislados procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina	125
4.4.2C. Análisis de los perfiles genotípicos y su asociación con los fenotipos de resistencia de los aislados procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina	126
4.5 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL GEN <i>tet</i> (M) DETECTADO EN LOS AISLADOS DE <i>E. coli</i> PROCEDENTES DE CERDOS TRATADOS CON COLISTINA	130
4.5.1. Detección de los transposones Tn916, Tn5397 y Tn5801	134

4.5.2 Resultados del estudio de la posible transferencia por conjugación del gen <i>tet(M)</i> a través de la técnica de <i>filter mating</i>	135
4.5.3. Resultados de la secuenciación y relación filogenética del gen <i>tet(M)</i> detectado en los aislados de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus spp.</i> procedentes de cerdos tratados con colistina	138
5. CONCLUSIONES	141
6. BIBLIOGRAFÍA	145

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de genes de resistencia y para la amplificación de la región QRDR de los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i>	49
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la tipificación de las cepas de <i>E. coli</i> por REP-PCR.....	57
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la detección de los genes <i>xis-Tn</i> , <i>tndX</i> e <i>int</i>	61
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la secuenciación del gen <i>tet(M)</i>	68
Tabla 5. Sensibilidad a los diferentes antimicrobianos del total de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los cerdos tratados con colistina en las tres etapas del ensayo.....	77
Tabla 6. Sensibilidad a colistina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de las tres etapas del ensayo según la dosis administrada.....	79
Tabla 7. Sensibilidad a amoxicilina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de las tres etapas del ensayo según la dosis de colistina administrada.....	83
Tabla 8. Frecuencia de detección de los genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-1} y <i>bla</i> _{SHV} en la selección de aislados de <i>E. coli</i> resistentes a amoxicilina procedentes de las tres etapas del ensayo.....	85
Tabla 9. Sensibilidad a doxiciclina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de las tres etapas del ensayo según la dosis de colistina administrada.....	88
Tabla 10. Frecuencia de detección de los genes <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> y <i>tet(M)</i> en los aislados de <i>E. coli</i> resistentes y altamente resistentes a doxiciclina seleccionados en las tres etapas del ensayo.....	90

Tabla 11. Sensibilidad a gentamicina de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de las tres etapas del ensayo según la dosis de colistina administrada.....	95
Tabla 12. Frecuencia de detección de los genes <i>aac(3)-II</i> , <i>aac(3)-IV</i> y <i>ant(2'')-I</i> en la selección de aislados resistentes a gentamicina.....	100
Tabla 13. Sensibilidad de los aislados de <i>E. coli</i> a enrofloxacin a lo largo de las tres etapas del ensayo según la dosis de colistina administrada.....	103
Tabla 14. Cambios en los aminoácidos de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de las proteínas GyrA y ParC de los aislados altamente resistentes y resistentes procedentes de las tres etapas del ensayo.....	107
Tabla 15. Fenotipos de resistencia detectados en el total de los aislados de <i>E. coli</i> en las tres etapas del ensayo.....	110
Tabla 16. Fenotipos de resistencia detectados en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina a lo largo de las tres etapas del ensayo.....	113
Tabla 17. Fenotipos de resistencia detectados en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina a lo largo de las tres etapas del ensayo.....	115
Tabla 18. Fenotipos de resistencia detectados en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina a lo largo de las tres etapas del ensayo.....	116
Tabla 19. Aislados de <i>E. coli</i> incluidos en el estudio del gen <i>tet(M)</i> y detección de los transposones Tn916, Tn5397 y Tn5801.....	131
Tabla 20. Aislados de <i>enterococcus spp.</i> incluidos en el estudio del gen <i>tet(M)</i> y detección de los transposones Tn916, Tn5397 y Tn5801.....	132
Tabla 21. Resultados de los ensayos de conjugación.....	137

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Estrategias de secuenciación del gen <i>tet(M)</i>	69
Figura 2. Similitud genética y fenotipos de resistencia de los aislados de <i>E. coli</i> obtenidos antes de iniciar el tratamiento con colistina.....	119
Figura 3. Similitud genética y fenotipos de resistencia de los aislados de <i>E. coli</i> obtenidos al finalizar el tratamiento con colistina.....	120
Figura 4. Similitud genética y fenotipos de resistencia de los aislados de <i>E. coli</i> obtenidos cuatro semanas después de finalizar el tratamiento con colistina.....	121
Figura 5. Similitud genética y fenotipos de resistencia de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes del animal 2 (grupo de tratamiento de 5 mg/kg/día de colistina).....	124
Figura 6. Similitud genética y fenotipos de resistencia de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes del animal 3 (grupo de tratamiento de 10 mg/kg/día de colistina).....	127
Figura 7. Similitud genética y fenotipos de resistencia de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes del animal 7 (grupo de tratamiento de 15 mg/kg/día de colistina).....	128
Figura 8. Árbol filogenético del gen <i>tet(M)</i>	139

LISTADO DE ABREVIATURAS

AAC	Enzima N-acetiltransferasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala.....	Alanina
AMX.....	Amoxicilina
AMX ^r	Resistente a amoxicilina
ANT	Enzima O-nucleotidiltransferasa
APC	Agentes promotores del crecimiento
APH.....	Enzima O-fosfotransferasa
Arg	Arginina
ARN.....	Ácido ribonucleico
ARN _m	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
Asn	Asparagina
Asp.....	Ácido aspártico
AT	Etapas anteriores al tratamiento con colistina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Colección Americana de Cultivos Tipo)
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (adenosin trifosfato)
<i>attI</i>	En los integrones, sitio de recombinación reconocido por la enzima integrasa
BHI	<i>Brain and heart infusion</i> (caldo infusión cerebro corazón)
bla.....	Gen de resistencia a β -lactámicos
BLEE	Betalactamasa de espectro extendido
bp.....	<i>Base pairs</i> (pares de bases)

°C	Grados centígrados
CE.....	Comunidad Europea
CICYT.....	Nomenclatura interna para identificar los aislados bacterianos de este estudio
CRSA	Centre de Recerca en Sanitat Animal
COL	Colistina
COL ^r	Resistente a colistina
DANMAP.....	<i>The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme</i> (Programa Danés Integrado de Investigación y Monitorización de Resistencias Antimicrobianas)
DOX.....	Doxiciclina
DOX ^r	Resistente a doxiciclina
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilendiaminotetraacético)
EMA	<i>European Medicines Evaluation Agency</i> (Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos). Actualmente EMA (<i>European Medicines Agency</i>)
ENR	Enrofloxacin
ENR ^r	Resistente a enrofloxacin
FT	Etapas final del tratamiento con colistina
x g	Fuerza centrífuga
GEN.....	Gentamicina
GEN ^r	Resistente a gentamicina
Ile.....	Isoleucina
<i>int</i>	Gen que codifica una enzima integrasa
<i>int1</i>	Gen que codifica la integrasa de los integrones de clase 1
<i>int2</i>	Gen que codifica la integrasa de los integrones de clase 2
IN	Etapas inicial, antes del tratamiento con colistina
Kb.....	Kilobases
Kg.....	Kilogramo

LB.....	Medio de cultivo Luria-Bertani
Leu	Leucina
mg.....	Miligramos
ml.....	Mililitros
mm	Milímetros
Mm	Milimolar
NADPH.....	Nicotinamida Adenina dinucleótido Fosfato
NCCLS	<i>National Committe of Clinical Laboratory Standars</i> (Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos)
nm	Nanómetros
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marco Abierto de Lectura)
PBPs.....	<i>Penicillin-Binding Proteins</i> (Proteínas de Unión a Penicilinas)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PT.....	Etapas posteriores al tratamiento con colistina
pv.....	Peso vivo
<i>qacEΔ1</i>	Delección del gen <i>qacE</i> de resistencia a antisépticos derivados del amonio cuaternario
<i>qnr</i>	Gen codificador de proteínas Qnr implicada en la resistencia a quinolonas
QRDR	<i>Quinolone Resistance-Determining Region</i> (Región Determinante de Resistencia a Quinolonas)
REP.....	<i>Repetitive Extragenic Palindromic Sequence</i> (Secuencia Palindrómica Extragénica Repetitiva)
Ser	Serina
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (paquete Estadístico par las Ciencias Sociales)
TAE.....	Tris-acetato EDTA
Thr	Treonina
Tn.....	Transposón

<i>tndX</i>	Gen que codifica una enzima resolvasa del transposón Tn5397
µg.....	Microgramos
µ.....	Microlitros
µm	Micrómetros
µM	Micromolar
UPGMA.....	Unweighted <i>pair group method with arithmetic mean</i> (método del promedio entre grupos)
<i>Vs</i>	<i>versus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organización Mundial de la Salud)
<i>xis-Tn</i>	Gen que codifica una enzima necesaria para la escisión del transposón Tn916

RESUMEN

En la actualidad, la eficacia de muchas sustancias antimicrobianas ha quedado mermada debido a las resistencias que los microorganismos han desarrollado frente a ellas. Este grave problema sanitario se ha relacionado con la administración de antibióticos a los animales de abasto, motivo por el cual en los últimos años se han tomado medidas legales para regular el consumo de antimicrobianos por parte de estos animales, medidas entre las que se incluye la prohibición del empleo de estos fármacos como agentes promotores del crecimiento y la creación de programas de monitorización de resistencias antimicrobianas. Sin embargo, el empleo de antimicrobianos en ganadería resulta indispensable para asegurar el bienestar animal y evitar enfermedades zoonóticas que pudieran llegar a transmitirse al ser humano y, por ello, se hace necesaria la realización de estudios *in vivo* que evalúen el riesgo de aparición de resistencias antimicrobianas que existe al llevar a cabo la administración de un tratamiento antimicrobiano en los animales de abasto.

La mayoría de los tratamientos antibióticos en animales se realiza por vía oral y empleando una dosis determinada que es la dosis terapéutica. No obstante, los antimicrobianos empleados como promotores del crecimiento se utilizaban a dosis sub-terapéuticas y, por ello, resulta interesante determinar si el riesgo de aparición de resistencias varía al emplear dosis superiores o inferiores a las dosis marcadas como terapéuticas. Por otra parte, al realizarse los tratamientos vía oral, los microorganismos más expuestos a estos antimicrobianos son los integrantes de la microbiota intestinal, tales como *Escherichia coli*, bacteria propuesta también por la EMEA como microorganismo representante de los microorganismos gram-negativos en los programas de seguimiento de resistencias.

El presente estudio se creó con el fin de evaluar el riesgo de aparición de resistencias antimicrobianas en *E. coli* al administrar por vía oral en el agua de bebida diferentes dosis de un mismo antimicrobiano, que en este caso fue la colistina o polimixina E, analizando la

aparición de resistencias frente a la colistina y la posible aparición de resistencias frente a otros cuatro antimicrobianos representativos de los principales grupos de antibióticos que existen en la actualidad y que fueron los siguientes: la amoxicilina (representante de los β -lactámicos), la doxiciclina (representante de las tetraciclinas), la gentamicina (representante de los aminoglucósidos) y la enrofloxacin (representante de las fluoroquinolonas) . Para ello, se emplearon 12 cerdos distribuidos en 3 grupos de 4 animales cada uno, de forma que cada uno de estos grupos recibió una dosis diferente de colistina durante 5 días. Así, a un grupo se le administró una dosis de 5 mg/kg/día de colistina (dosis sub-terapéutica), a otro 10 mg/kg/día (dosis terapéutica) y a otro 15 mg/kg/día (dosis superior a la terapéutica). Para evaluar la evolución de las resistencias, se tomaron muestras del contenido ileal antes de iniciar la administración de colistina (AT), al finalizar el tratamiento con colistina (FT) y cuatro semanas después de haber terminado el tratamiento (PT).

El estudio de la evolución de las resistencias reveló que la dosis de colistina administrada no parece ejercer una influencia clara sobre la aparición de aislados de *E. coli* resistentes a los antimicrobianos analizados, aunque el modelo experimental planteado en este ensayo no nos permitió evaluar correctamente el riesgo de aparición de estas resistencias al detectarse porcentajes de resistencia iniciales elevados frente a varios de los antimicrobianos ensayados como la amoxicilina o la doxiciclina.

El porcentaje de aislados de *E. coli* resistentes a gentamicina experimentó un aumento estadísticamente significativo al finalizar la administración por vía oral de colistina en todos los grupos de tratamiento, indicando una posible resistencia cruzada entre la colistina y la gentamicina.

El análisis por PCR de algunos de los genes implicados en la aparición de resistencias frente a los antimicrobianos incluidos en este estudio reveló que el gen de resistencia a β -lactámicos presente en todos los aislados de *E. coli* incluidos en el ensayo fue el gen *bla*_{TEM}. Dentro de los genes de resistencia a gentamicina, se estudiaron los genes *aac*(3)-II, *aac*(3)-IV y *ant*(2'')-I, siendo el gen *aac*(3)-II el más detectado. En cuanto a las resistencias frente a

enrofloxacin, el análisis de las mutaciones de la región QRDR de los genes *gyrA* y *parC* reveló que las mutaciones más frecuentes en la proteína GyrA fueron Asp-87 → Asn y Ser-83 → Val, siendo la primera vez que se describe esta última mutación espontánea en aislados de *E. coli* de origen porcino. Las mutaciones más frecuentes en la proteína ParC fueron Ser-80 → Arg. También se analizaron los genes de resistencia a tetraciclinas *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(M)*. El gen *tet(A)*, solo o en combinación con otros genes de resistencia a tetraciclinas, fue el gen con mayor frecuencia de detección. Cabe destacar que el gen *tet(M)*, gen de resistencia a tetraciclinas normalmente detectado en bacterias gram-positivas y no en gram-negativas, se detectó en un total de 13 aislados de *E. coli* obtenidos en la etapa FT. Este resultado nos llevó a plantear la hipótesis de que el gen *tet(M)* detectado en nuestros aislados procediera de otra bacteria gram-positiva presente en el medio intestinal como *Enterococcus spp.* Por ello, se realizaron estudios de transferencia *in vitro* del gen *tet(M)* entre *E. coli* y *Enterococcus spp.*, comprobándose que dicha transferencia era posible. Además, se realizó un estudio con los 13 aislados de *E. coli* portadores del gen *tet(M)* y 36 aislados de enterococos *tet(M)* positivos procedentes de los mismos animales en los que se había detectado el gen *tet(M)* en los aislados de *E. coli*. En ellos se analizó la presencia de los transposones Tn916, Tn5397 y Tn5801, donde habitualmente se localiza el gen *tet(M)*, y se secuenciaron los genes *tet(M)* detectados. El análisis filogenético de las secuencias del gen *tet(M)* presente en los aislados de *E. coli* y en los enterococos sugirió que el gen *tet(M)* detectado en los aislados de *E. coli* podría tener una localización plasmídica y que su secuencia no estaba relacionada filogenéticamente con las secuencias del gen procedente de los enterococos.

El análisis genotípico de los aislados de *E. coli* obtenidos a lo largo del ensayo reveló que la administración por vía oral de colistina, con independencia de la dosis suministrada, parece provocar un cambio en la población mayoritaria de *E. coli* presente en el medio intestinal de los cerdos, favoreciendo la aparición de una población genotípicamente más homogénea que la detectada antes de iniciar el tratamiento y caracterizada por presentar un fenotipo mayoritario de resistencia que fue el fenotipo Dox^r-Amox^r-Gen^r.

SUMMARY

Currently, the effectiveness of many antimicrobial substances has been reduced due to the resistance that microorganisms have developed against them. This serious public health and veterinary problem has been related to the administration of antibiotics to food animals, and this is the reason why in the last years legal measures have been taken to regulate the use of antimicrobials in animals, measures that include the prohibition of the use of these drugs as growth promoters and the creation of antimicrobial resistance monitoring programs. However, the use of antimicrobials in livestock is essential to ensure animal welfare and prevent zoonotic diseases that may be transmitted to humans and, therefore, it is necessary to do *in vivo* studies to assess the risk of the development of antimicrobial resistance when an antimicrobial treatment is administrated in food animals.

Most of the antimicrobial treatments in food animals are given orally using the so-called therapeutic dose. However, the antimicrobials used as growth promoters were used in sub-therapeutic doses and, therefore, it is interesting to determine whether the risk of emergence of resistance changes when doses higher or lower than therapeutic doses are used. Moreover, when performing oral treatment, the microorganisms more susceptible to these antimicrobials are those of the intestinal microbiota, such as *Escherichia coli*, bacteria which has been proposed by the EMEA as a representative of gram-negative bacteria in monitoring programs.

This study was established to assess the risk of the development or selection of antimicrobial resistance *E. coli* in pigs after the administration in the drinking water of different doses of colistin or polymyxin E, analyzing the development of resistance against colistin and the possible emergence of resistance to four antimicrobial representing the most important groups of antibiotics: amoxicillin (representing the β -lactam), doxycycline (tetracycline representative), gentamicin (representative of aminoglycosides) and

enrofloxacin (representative of fluoroquinolones). For this study, 12 pigs divided in 3 groups of 4 animals were used. Each of these groups received different doses of colistin for 5 days. Thus, one group received a dose of 5 mg / kg / day (sub-therapeutic dose), another received 10 mg / kg / day (therapeutic dose) and the third group received 15 mg / kg / day (higher than therapy dose). To evaluate the evolution of resistance, samples of ileal contents were taken in three different stages: before the administration of colistin (AT), after the treatment with colistin (FT) and four weeks after the treatment with colistin (PT).

The analysis of the evolution of resistance showed that the dose of colistin does not appear to have a clear influence on the occurrence of *E. coli* isolates resistant to the antimicrobial agents tested, although in some cases, the experimental model used in this study did not allow us a properly assessment of the risk of the development or selection of resistance due to the high initial rates of resistance detected against some of the antimicrobial tested such as amoxicillin and doxycycline.

The percentage of *E. coli* isolates resistant to gentamicin experienced a statistically significant increase at the end of the oral administration of colistin in all treatment groups, indicating a possible cross-resistance between colistin and gentamicin.

PCR analysis of some of the genes responsible for resistance to the antimicrobials included in this study revealed that the *bla*_{TEM} gene was present in all the *E. coli* isolates resistant to amoxicillin analyzed. Within the gentamicin resistance genes, genes *aac* (3)-II, *aac* (3)-IV and *ant* (2 "-)-I were analyzed and the *aac* (3)-II gene was the most frequently detected. In relation to the resistance against enrofloxacin, the analysis of mutations in the region QRDR of the genes *gyrA* and *parC* revealed that the most frequent mutations in the protein were GyrA Asp → Asn-87 and Ser-83 → Val, being the first time that the latter spontaneous mutation has been described in *E. coli* isolates from pigs. The most frequent mutations in the ParC protein was Ser-80 → Arg. The tetracycline resistance genes *tet* (A), *tet* (B) and *tet* (M) were also analyzed. The *tet*(A) gene, alone or in combination with other genes of tetracycline resistance, was the most commonly detected. It is noticeable that, the *tet*(M)

gene, which is normally found in gram-positive but not in gram-negative bacteria, was detected in a total of 13 *E. coli* isolates obtained in the stage FT. This result led us to hypothesize that the *tet*(M) gene detected in our isolates might have come from a gram-positive bacteria present in the intestinal environment, such as *Enterococcus spp.* Therefore, studies of *in vitro* transfer of *tet*(M) gene between *E. coli* and *Enterococcus spp.* were performed, proving that this transfer is possible. We also performed a study with the 13 isolates of *E. coli* carrying the *tet*(M) gene and 36 *tet*(M) positive enterococci isolated from the same animals in which the *tet*(M)-positive *E. coli* isolates were detected. In all of these isolates the presence of the transposons Tn916, Tn5397 and Tn5801, where the gene *tet*(M) is usually located, was analyzed and the *tet*(M) genes detected in them were sequenced. The results suggest that the *tet*(M) gene detected in the *E. coli* isolates may have a plasmid location. Moreover, a phylogenetic analysis demonstrated that the sequence of *E. coli tet*(M) gene was not phylogenetically related with the sequences of previously described *tet*(M) genes, including those from different *Enterococcus* species.

Genotypic analysis of *E. coli* isolates obtained in this study revealed that oral administration of colistin, regardless of the administered dose, appears to cause a change in the predominant population of *E. coli* present in the intestinal microbiota of pigs, favoring the development of a population genotypically more homogeneous than that detected before the treatment and characterized by having a majority phenotype of resistance, Dox^r-Amox^r-Gen^r phenotype.

1-INTRODUCCIÓN

1.1. USO DE ANTIMICROBIANOS EN ANIMALES DE PRODUCCIÓN Y POSIBLES IMPLICACIONES EN LAS RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS EN MEDICINA HUMANA.

Uno de los mayores hallazgos de la historia de la medicina ha sido sin duda el descubrimiento de los antibióticos. Desde que Fleming observara en 1928 la primera sustancia con propiedades antimicrobianas hasta la actualidad, son muchos los compuestos con propiedades antibacterianas que se han descubierto y empleado tanto en medicina humana como veterinaria. Sin embargo, el uso de los antimicrobianos siempre ha ido paralelo a la existencia de resistencias antibióticas, ya que poco después de la aparición de los primeros antibióticos también empezaron a surgir los primeros problemas de resistencia antimicrobiana. De esta forma, la sensibilidad a la penicilina de *Staphylococcus aureus* se redujo considerablemente a finales de la década de los años 50 debido a la producción de β -lactamasas (Abraham y Chain, 1988). También durante esa década, los microorganismos gram-negativos, y en especial las enterobacterias, comenzaron a hacerse resistentes a la acción de la estreptomina. A lo largo de las siguientes décadas, el número de especies bacterianas resistentes a diferentes antibióticos se fue incrementando y en los años 90 del siglo pasado las resistencias antimicrobianas ya se consideraron un grave problema para la Salud Pública. Lejos de solucionarse, este problema sanitario continúa acentuándose en la actualidad y de seguir así, hay investigadores que incluso piensan que podríamos estar en los albores de la era post-antibiótica (Prescott, 2006).

El empleo de antibióticos en medicina veterinaria comenzó de forma simultánea al uso de estos fármacos en medicina humana y su uso ya estaba bastante extendido poco después de la Segunda Guerra Mundial, suponiendo un gran avance en el tratamiento de enfermedades que, hasta ese momento, habían mermado la producción de las explotaciones ganaderas (Prescott, 2006). Sin embargo, en medicina veterinaria, a diferencia de lo que ocurre en medicina humana, los antibióticos no sólo se han utilizado con fines terapéuticos, sino que también se han empleado en profilaxis, metafilaxis y como promotores de crecimiento. Cuando un antibiótico se emplea de forma terapéutica, se persigue el tratamiento y curación de un proceso patológico ya instaurado en el animal. La profilaxis se refiere al uso de antibióticos en

animales sanos pero que podrían llegar a enfermar debido a que estén sometidos a una presión de infección y/o a una situación de estrés como puede ser el momento del destete, la vacunación, el transporte, etc. La metafilaxis es el empleo de antibióticos en masa en animales aún sanos pero que podrían estar incubando una determinada enfermedad que ya se ha manifestado en otros animales de su misma explotación o grupo de edad. El empleo de antibióticos como agentes promotores de crecimiento (APC) hace referencia al uso durante amplios periodos de tiempo de dosis sub-terapéuticas de antibióticos administrados vía oral en animales sanos con el único objetivo de incrementar el índice de crecimiento y la productividad de los animales, siendo esta aplicación la más controvertida, ya que muchos de los antibióticos empleados para este fin eran también utilizados de forma terapéutica en medicina humana.

El uso de antibióticos tiende a producir la selección de bacterias resistentes y parece existir una estrecha relación entre la cantidad de antibióticos consumida y el nivel de resistencia desarrollado (Aarestrup y Wegener, 1999). Aunque el consumo real de antibióticos por parte de los animales es un dato poco accesible y varía enormemente de unos estudios a otros, en el año 1997, se estimó que en los 15 países miembros de la Unión Europea y en Suiza se habían empleado un total de 6500 toneladas de antibióticos en animales de abasto, de los cuales el 25 % se correspondía con aditivos ionóforos, empleados principalmente en producción aviar, mientras que, de las 5000 toneladas restantes, aproximadamente 1600 toneladas se habían empleado como promotores del crecimiento y el resto como antibióticos prescritos de forma terapéutica para el tratamiento de alguna enfermedad (Stein, 2002). Comparando el consumo de antibióticos entre animales y seres humanos, cabe destacar que, según la Agencia Europea del Medicamento, en el año 1999, del total de antibióticos empleados en la Unión Europea, el 52 % habían sido consumidos por el ser humano, mientras que el 33 % se habían empleado en medicina veterinaria y un 15 % habían sido utilizados como promotores de crecimiento (EMEA, 1999).

Los APC se comenzaron a emplear a finales de los años 40 y principios de los años 50, cuando se comprobó que ciertos subproductos de la industria farmacéutica provocaban un efecto

beneficioso sobre el crecimiento de los animales y que ese efecto se debía a los residuos de antibióticos presentes en ellos. El mecanismo de acción de los APC aún no se conoce por completo (Prescott, 2006). Sin embargo, parece que se debe a la interacción entre el antimicrobiano administrado vía oral y la microbiota intestinal (Dibner y Richards, 2005). Los microorganismos de la flora intestinal ejercen un papel beneficioso para su hospedador, participando en la degradación de algunos principios activos de los alimentos, en la absorción de minerales, en la degradación de ciertas sustancias tóxicas, manteniendo la integridad del epitelio intestinal y evitando la colonización del intestino por microorganismos patógenos (Quiles, 2006). Sin embargo, la microbiota también compete con el hospedador por ciertos nutrientes, promueve la renovación de las células del epitelio intestinal incrementando la secreción de mucus y provoca una estimulación del sistema inmunológico desarrollando respuestas inflamatorias (Dibner y Richards, 2005). Todo esto conlleva una demanda energética que influye negativamente en la tasa de crecimiento del animal. El empleo de APC parece provocar un efecto directo sobre la microbiota intestinal, reduciendo la competencia por determinados nutrientes y disminuyendo la formación de metabolitos que ejercerían un efecto negativo sobre el crecimiento del animal. Además, los APC parecen provocar una reducción del espesor de la pared intestinal y de la lámina propia que podría explicar el aumento en la digestibilidad de ciertos nutrientes que se observa en los animales de producción en los que se emplean estos compuestos (Dibner y Richards, 2005).

Al comenzarse a utilizar los antibióticos como promotores de crecimiento no se consideró que su administración en los animales de producción pudiera tener repercusión en el nivel de resistencias antibióticas en el ser humano. Sin embargo, en el año 1969 ya se comenzaron a oír las primeras voces de alarma en el Reino Unido con la publicación del informe Swann (Swann, 1969) que alertaba de la posible transmisión de bacterias resistentes de los animales al ser humano (Torres y Zarazaga, 2002) y recomendaba que no se empleasen como APC antibióticos que se utilizaran en medicina humana. Probablemente, este informe tuvo mucho que ver con el hecho de que en el año 1970 la CEE publicara la Directiva 70/524 sobre los aditivos en alimentación animal donde se prohibía expresamente el uso de antibióticos como la penicilina o la oxitetraciclina como APC en el pienso de animales destinados al consumo humano. Después de la publicación de esta directiva, la lista de antibióticos empleados como aditivos se

revisó en varias ocasiones, restringiéndose cada vez más el número de antibióticos autorizados ante la preocupante relación que parecía existir entre el uso de estas sustancias en la alimentación animal y el incremento de resistencias en microorganismos patógenos que afectaban al ser humano o a los animales (Piddock, 1996; Witte, 1998). Ante esta problemática, la Organización Mundial de la Salud llevó a cabo en 1997 un estudio (The Medical Impact of the Use of Antimicrobials in Food Animals: Report and Proceedings of a WHO Meeting, Berlin, Germany, 13–17 October 1997, WHO/EMC/ZOO/97.4) en el que se analizaba el impacto que podía tener en medicina humana el uso de antibióticos en animales de producción destinados al consumo y cuya finalidad fue elaborar una serie de pautas y recomendaciones que ayudasen a controlar la emergente problemática de las resistencias antimicrobianas en los animales de producción, instando a la creación de programas de control y monitorización de resistencias y al uso prudente y racional de los antibióticos por parte de los veterinarios y ganaderos (Shryock y Richwine, 2010). A partir de entonces, organizaciones internacionales como la Organización Mundial para la Salud Animal (OIE), Codex Alimentarius, la Asociación Mundial de Veterinarios o la Federación de Veterinarios Europeos elaboraron también guías encaminadas a concienciar acerca del problema de las resistencias y a moderar en la medida de lo posible el uso de antibióticos en la producción animal (Shryock y Richwine, 2010). De esta forma, y siguiendo estas recomendaciones, se fueron creando redes de vigilancia de resistencias a antibióticos en los diferentes países de la UE, como por ejemplo la Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencia a Antibióticos (VAV) creada en España en el año 1997 y que publica anualmente informes sobre las resistencias antimicrobianas en animales sanos, animales enfermos y en alimentos de origen animal (Moreno *et al.*, 2000). El control del uso de antibióticos en los animales de producción alcanzó su punto álgido en Enero del año 2006 con la prohibición en la Unión Europea del uso de antimicrobianos a dosis sub-terapéuticas con fines productivos (Reglamento de la CE 1831/2003), aunque en ese momento ya eran muchos los países de la UE que, como Suecia, Alemania o Dinamarca, habían decidido abolir el uso de APC de forma voluntaria hacía años, obteniendo con ello resultados positivos en cuanto al descenso de resistencias (Aarestrup *et al.*, 2001). Tras la prohibición del uso de antibióticos como APC, las instituciones siguen preocupadas por el problema de las resistencias antimicrobianas, tal y como lo demuestran la creación en el año 2006 del Laboratorio Central de Referencia para la Resistencia a los Antimicrobianos (CRL-AR), ubicado en el *National Food Institute*, Universidad Técnica de Dinamarca (Copenhague) o la celebración

de una reunión en Bruselas en el año 2008 donde se revisaron las medidas de control establecidas en la UE (Meeting on the Review of work underway on Antimicrobial Resistance, Brussels, 17, January, 2008). También la EMEA (ahora EMA) creó el Grupo Científico Asesor en Resistencias Antimicrobianas (SAGAM), con la finalidad de seguir analizando las resistencias antibióticas y su implicación en Salud Pública. Además, desde el año 2001, este organismo propone que para el registro de cualquier nuevo producto en Europa se deben realizar previamente estudios de análisis de riesgo sobre la generación de resistencias (EMEA/CVMP/244/01-FINAL).

Por tanto, es un hecho que, actualmente y desde hace 5 años, el empleo de antibióticos como promotores de crecimiento está completamente prohibido en toda la Unión Europea y, por ello, no dejan de investigarse alternativas como el empleo de probióticos, prebióticos, enzimas, sales y otras sustancias que sean capaces de modular la actividad de los microorganismos de la microbiota intestinal incrementando la ganancia de peso y minimizando la aparición de enfermedades (Stein, 2002; Verstegen y Williams, 2002). De hecho, autores como Casewell *et al.* (2003) ponen de manifiesto que la prohibición de APC ha provocado un incremento en la prescripción de antibióticos con fines terapéuticos y, en países como Suecia, este aumento en el uso de antibióticos de forma terapéutica se hizo manifiesto al incrementarse la incidencia de diarreas post-destete en lechones causadas por *E. coli*, *Clostridium perfringens* y *Lawsonia colibacillosis* poco después de la prohibición del uso de APC (McDermott *et al.*, 2002; Stein, 2002; Yan y Gilbert, 2004). Callesen *et al.* (2003) aseguran que esta prohibición ha causado graves pérdidas en el sector del ganado porcino al detectarse descensos en la ganancia media diaria y aumentos en el índice de mortalidad. Así, aunque se prohíba el uso de los antimicrobianos como agentes promotores del crecimiento, el uso de estos medicamentos de forma terapéutica y preventiva es ineludible, más aún teniendo en cuenta que la demanda actual de productos de origen animal por parte de la sociedad hace que sea casi inevitable la imposición de sistemas de producción intensivos donde el hacinamiento de los animales favorece la aparición de enfermedades infecciosas y, por tanto, también el uso de antibacterianos, necesarios para poder tratar y prevenir la aparición de estas enfermedades y asegurar la salud y el bienestar de los animales, además de controlar la posible transmisión de enfermedades zoonóticas de origen alimentario. Por tanto, asumiendo el uso imprescindible de antimicrobianos en animales de producción, parece necesaria la realización de estudios que ayuden a comprender la generación de resistencias

antimicrobianas en animales y que nos permitan establecer las pautas de tratamiento más adecuadas que mantengan el efecto terapéutico del antibiótico y que ayuden a minimizar, en la medida de lo posible, la aparición de resistencias antimicrobianas tanto en animales como en el ser humano.

1.2. *Escherichia coli* Y SU IMPORTANCIA EN EL ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS.

Escherichia coli es una bacteria gram-negativa y anaerobia facultativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que se encuentra de forma natural formando parte de la microbiota intestinal de seres humanos y animales, localizándose principalmente en la mucosa del colon (Kaper *et al.*, 2004) y que también puede encontrarse de forma ubicua en el medio ambiente. Sin embargo, *Escherichia coli* también puede actuar como un microorganismo patógeno tanto en seres humanos como en animales, provocando alteraciones intestinales (enfermedad entérica/diarreica) o extra intestinales (infecciones urinarias y septicemia/meningitis) o causando otras alteraciones actuando como patógeno oportunista (Kaper *et al.*, 2004).

Como ya se ha comentado, una de las principales localizaciones de *E. coli* es el medio intestinal. El intestino es un medio estéril en el momento del nacimiento (Dibner y Richards, 2005), pero poco después es colonizado por múltiples microorganismos procedentes de la madre y del medio ambiente, convirtiéndose en un ecosistema dinámico y cambiante formado por microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos cuyo número y proporción varía durante las primeras semanas de vida de forma acuciante (Konstantinov *et al.*, 2004; Lalles *et al.*, 2007). En los seres humanos y en los animales adultos la composición de la microbiota intestinal se puede considerar como estable, aunque en cada una de las especies que forman este complejo ecosistema existe una enorme variabilidad poblacional, teniendo en cuenta también que ciertos factores externos como la dieta y el estrés, debido por ejemplo a un

tratamiento antimicrobiano, pueden provocar alteraciones cuantitativas y cualitativas en la composición de la microbiota (Tannock y Savage, 1974; Castillo *et al.*, 2007).

En el caso del ganado porcino, especie animal empleada en este estudio, la microbiota intestinal durante los primeros días de vida está compuesta principalmente por bacterias aerobias y anaerobias facultativas entre las que se encuentran bacterias ácido-lácticas, estreptococos y *E. coli* (Dibner y Richards, 2005). Mientras los lechones se alimentan de leche materna, esta población bacteriana es constante y estable. Sin embargo, en el momento del destete se producen cambios en la composición y proporción de los microorganismos que integran la microbiota, apareciendo en este momento los microorganismos anaerobios estrictos y decreciendo el número de microorganismos anaerobios facultativos como *E. coli*, que permanecerá colonizando principalmente el colon de los animales (Kaper *et al.*, 2004; Konstantinov *et al.*, 2004). Este periodo de tiempo en que el lechón es destetado (a los 21-35 días de vida en los sistemas de producción intensivos) supone un gran estrés para el animal, ya que es separado de su madre e introducido en un nuevo medio ambiente, cambiando además de forma brusca su alimentación. Este estrés también lo sufre el aparato digestivo del lechón y la microbiota intestinal y es por ello que en esta etapa de la vida puede producirse una alta morbilidad de enfermedades intestinales potencialmente graves cuyo síntoma principal es la diarrea (Konstantinov *et al.*, 2004; Lalles *et al.*, 2007) que ocasionan una disminución de la ganancia de peso media diaria y cierto grado de mortalidad, consecuencias que el uso de antibióticos como APC lograba minimizar.

Debido a su gran ubicuidad y al hecho de ser un microorganismo muy abundante, *Escherichia coli* es un excelente indicador del nivel de resistencias antimicrobianas en los microorganismos de la microbiota intestinal, habiendo siendo empleada frecuentemente para este fin en el ganado porcino (Sunde *et al.*, 1998; Sorum y Sunde, 2001). Algunos estudios señalan que después de la introducción del uso de un antimicrobiano en veterinaria se detectan incrementos en la prevalencia de bacterias patógenas y comensales resistentes (van den Bogaard y Stobberingh, 2000). Además, se ha comprobado que *E. coli* es un importante reservorio de determinantes de resistencia que pueden ser intercambiados entre

microorganismos de animales o entre microorganismos de animales y de seres humanos, bien por contacto directo o indirecto a través de la cadena alimentaria (Collignon y Aarestrup, 2007; Bibbal *et al.*, 2009). Por todo ello, la Agencia Europea de Medicamentos establece que se debe analizar el perfil de resistencias a antimicrobianos de cepas de *E. coli* como bacteria representante de los microorganismos gram-negativos y de *Enterococcus spp.* como representante de los gram-positivos en los programas de seguimiento de resistencias derivadas del uso de antibióticos en medicina veterinaria (EMA/CVMP/244/01-FINAL) y, de hecho, es una de las llamadas “bacterias indicadoras” cuyos niveles de resistencia se analizan en las Redes de Vigilancia de Resistencias a Antibióticos, como la danesa DANMAP o la española VAV, por ser consideradas bacterias capaces de aportar una estimación veraz de la presión selectiva a la que están sometidas y de los niveles de prevalencia de resistencia en la población (van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Anderson *et al.*, 2003).

En los últimos años se han realizado varios estudios en los que se pone de manifiesto la relación entre el uso de antibióticos en animales de producción y el incremento en las resistencias antimicrobianas en bacterias humanas (Smith *et al.*, 2002; Angulo *et al.*, 2004; Molbak, 2004). En la transmisión de resistencias de los animales de abasto al ser humano las bacterias intestinales comensales como *E. coli* o *Enterococcus faecium* parecen jugar un papel decisivo. Estas bacterias poseen una gran capacidad de adquisición y transmisión de elementos de resistencia y están expuestas directamente a los antibióticos, ya que muchos de los tratamientos se realizan vía oral. Esto hace que las bacterias de la microbiota se conviertan en excelentes reservorios de resistencia y que el medio intestinal sea un lugar idóneo para la transferencia de resistencias entre bacterias comensales de la misma especie, entre bacterias de diferentes especies o incluso, entre bacterias comensales y patógenas (Witte, 2000; Scott, 2002; Salyers *et al.*, 2004). En el momento del sacrificio del animal, si el manejo no es adecuado, las bacterias intestinales pueden contaminar fácilmente las canales y llegar así al ser humano a través de la cadena alimentaria, habiéndose postulado este mecanismo como una de las principales vías de transmisión de resistencias de los microorganismos animales a los del ser humano (Aarestrup y Wegener, 1999). De hecho, Manges y col. (2007) realizaron un estudio en el que se concluía que el origen de las cepas de *E. coli* multirresistentes que habían causado varias infecciones urinarias en el ser humano era alimentario.

Además de la vía alimentaria, parece que el contacto con los animales sometidos a tratamientos antibióticos también podría provocar la transferencia de resistencias entre los microorganismos animales y los del ser humano, siendo la vía fecal, y los microorganismos como *E. coli*, que normalmente se encuentran en las heces, decisivos en esta transmisión. Así, Oppegaard *et al.* (2001) encontraron exactamente el mismo plásmido de resistencia en bacterias coliformes multirresistentes aisladas del ganado vacuno y de los habitantes de la granja donde se encontraban esos animales. De igual forma, van den Boogart *et al.* (2001) realizaron un estudio comparando las cepas de *E. coli* de aves, de sus avicultores y del personal de matadero encargado de su sacrificio, concluyendo que existía una clara relación entre los patrones de resistencia encontrados entre las cepas de todos ellos. Además, encontraron el mismo perfil genotípico entre aislados de *E. coli* procedentes de un ave y de su granjero, resultado que no deja dudas acerca de la existencia de la relación entre las resistencias en los microorganismos aislados de los animales y del ser humano y de que en esta relación las bacterias intestinales como *E. coli* parecen ser fundamentales.

1.3. RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS: CÓMO LAS BACTERIAS HAN LOGRADO GANAR LA BATALLA A LOS ANTIMICROBIANOS.

1.3.1. Generalidades

Existen diferentes definiciones de resistencia antimicrobiana, aunque, bajo un criterio microbiológico, podemos decir que un aislado bacteriano resistente es aquel que es capaz de crecer en presencia de un antimicrobiano a una concentración mayor de la que pueden soportar otros aislados de su misma especie (Guardabassi y Courvalin, 2006).

En una bacteria, la resistencia frente a un antimicrobiano puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es una resistencia inherente a la bacteria, debida a factores estructurales o funcionales y no a alteraciones genéticas como, por ejemplo la resistencia a los macrólidos

observada en las bacterias gram-negativas como *E. coli* debida a la baja permeabilidad de la membrana externa frente a estos compuestos y a la existencia de bombas de flujo (Normark y Normark, 2002; McDermott *et al.*, 2003; Guardabassi y Courvalin, 2006). Sin embargo, la resistencia más importante desde el punto de vista clínico y de Salud Pública es la resistencia antimicrobiana adquirida, que es aquella resistencia que se produce únicamente en algunos miembros de un género o especie bacteriana como consecuencia de cambios en el genoma bacteriano (mutaciones) o por adquisición de elementos genéticos externos por transferencia horizontal, pudiéndose producir la transferencia de bacteriófagos, plásmidos, transposones o integrones por cualquiera de los tres mecanismos de intercambio de material genético que existen en las bacterias: transducción, transformación o conjugación (Cisterna, 1999; Guardabassi y Courvalin, 2006).

- **La transducción** consiste en la transferencia de material genético a través de un bacteriófago, es decir, de una partícula vírica que se ha replicado en un microorganismo donador y que posee parte de su ADN (Ochman *et al.*, 2000).

- **La transformación** es la captación por parte de una bacteria de material genético que se encuentra libre en el medio ambiente. Este método de transferencia de material genético es especialmente importante al permitir la transmisión de ADN entre microorganismos no relacionados. Algunas bacterias como *Haemophilus influenzae* son permanentemente competentes y pueden captar material genético a través de la transformación en cualquier momento. Sin embargo, otras, como *E. coli*, necesitan ciertas condiciones físicas o químicas que pueden ser inducidas *in vitro*, siendo esta la base de la clonación plasmídica, y otras, como *Bacillus subtilis* o *Streptococcus pneumoniae*, sólo son competentes tras alcanzar un cierto estadio fisiológico dentro de su ciclo de vida (Ochman *et al.*, 2000).

- **La conjugación** es el único método de transferencia horizontal de material genético que requiere contacto entre la bacteria donadora y la receptora. Este contacto se produce mediante la formación de *pilis* sexuales por los que se transfiere el ADN a través de **plásmidos**

o **transposones conjugativos**. Este es el mecanismo más importante de intercambio de genes de resistencia entre bacterias (Cisterna, 1999; Ochman *et al.*, 2000).

1.3.2. Elementos genéticos implicados en la transmisión de resistencias antimicrobianas.

La capacidad de una determinada bacteria de sobrevivir al efecto de un antimicrobiano debe ser una capacidad temporal y que pueda variar rápidamente, dada la gran cantidad de antibióticos a los que la bacteria puede estar expuesta en su medio ambiente. Por este motivo, no resulta sorprendente el hecho de que los genes de resistencia antimicrobiana se localicen en elementos genéticos móviles y fácilmente transferibles como son los **plásmidos, los transposones y los integrones**.

1.3.2.1. Plásmidos

Los plásmidos son fragmentos de ADN extra cromosómicos, autónomos y capaces de replicarse cuyo tamaño puede variar desde menos de 2 kb hasta más de 100 kb y que pueden ser portadores de genes de resistencia a antimicrobianos (plásmidos R), a desinfectantes, a metales pesados y/o a bacteriocinas, además de poder conferir elementos de virulencia (Schwarz, 2006). Aunque todos los plásmidos son elementos genéticos móviles, se distinguen dos tipos de plásmidos: los plásmidos móviles pero no conjugativos y los plásmidos conjugativos, siendo estos últimos los más importantes en la diseminación de los genes de resistencia, ya que contienen la información genética necesaria para iniciar por sí mismos el proceso de conjugación (Francia *et al.*, 2004).

En *E. coli* se han descrito plásmidos portadores de resistencia frente a tetraciclinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, β -lactámicos y sulfonamidas entre otros (Frasson *et al.*; Hentschke *et al.*; Valenzuela *et al.*, 1996; Enne *et al.*, 2001).

1.3.2.2. Transposones

Un transposón se define como un elemento genético móvil que contiene varios pares de kilobases de ADN que incluyen la información necesaria para llevar a cabo su migración (transposición) desde un locus genético a otro. A diferencia de lo que ocurre en otros procesos de transferencia horizontal de ADN entre bacterias, en la transposición no se requiere una elevada homología entre la secuencia del transposón y el lugar de inserción, por lo que los transposones son especialmente importantes en la diseminación de genes de resistencia entre bacterias no relacionadas (Mascaretti, 2003e).

Los transposones pueden estar incluidos en plásmidos, en el cromosoma bacteriano o incluso dentro de otros transposones (Alekhun y Levy, 2007).

La transposición puede llevarse a cabo por dos mecanismos: **transposición conservativa** y **transposición replicativa**. En la transposición conservativa el transposón pasa de una bacteria donadora a otra receptora sin que aumente el número de copias del transposón en el interior de las bacterias, es decir, ese transposón abandona la bacteria donadora y pasa a la receptora. Por el contrario, en la transposición replicativa, mediante un proceso de replicación y recombinación específica de sitio en la que interviene una enzima denominada resolvasa, se lleva a cabo una copia del transposón de la bacteria donadora que se transfiere a la bacteria receptora (Curcio y Derbyshire, 2003).

En la actualidad se han descrito diferentes tipos de transposones. Así, los elementos de transposición más simples consisten en **secuencias de inserción o elementos IS**. Un elemento IS es una pequeña secuencia de ADN (de 750 a 1600 pb) que únicamente contiene la

información genética necesaria para codificar la enzima (transposasa) implicada en la escisión e inserción de este elemento de transposición (Mascaretti, 2003e; Roberts *et al.*, 2008). Los elementos IS se caracterizan por estar flanqueados por dos secuencias idénticas o muy similares en orientación inversa, denominadas repeticiones invertidas o IR (del inglés: *inverted repeats*) que son reconocidas por la transposasa antes de llevarse a cabo la transposición. Por otra parte, se han descrito los **transposones compuestos** o *composite transposons*, que contienen un elemento de inserción (IS) con secuencias idénticas o muy similares en cada extremo y una región central que contiene un número variable de genes entre los que suelen encontrarse genes de resistencia. En este caso, al igual que en los elementos IS, es la transposasa la que reconoce los IR de los extremos y después lleva a cabo la escisión e integración de esta secuencia (Mascaretti, 2003e; Roberts *et al.*, 2008). El tercer tipo de elementos de transposición descritos lo constituyen los **transposones conjugativos**, también denominados elementos móviles de integración o ICEs (del inglés: *integrative conjugative elements*). Estos transposones contienen los genes necesarios para codificar las diferentes enzimas encargadas de la escisión e integración de la secuencia genética (enzimas integrasa y escisionasa) y de su transferencia conjugativa, además de multitud de genes accesorios entre los que se incluyen genes de resistencia a antibióticos (Hinerfeld y Churchward, 2001; Burrus *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2008). Los transposones conjugativos son especialmente relevantes en la diseminación de resistencias antimicrobianas, ya que tienen la capacidad de transferirse entre bacterias de diferentes especies y géneros y se han detectado en multitud de bacterias gram-positivas y gram-negativas. Dentro de los transposones conjugativos, el que primero se detectó y el mejor estudiado y caracterizado es el Tn916, un transposón de 18 kb que fue inicialmente identificado en *E. faecalis*, aunque actualmente se ha detectado en un amplio rango de bacterias entre las que se incluye *E. coli* (Clewell *et al.*, 1995). Este transposón confiere resistencia frente a tetraciclina y minociclina a través del gen *tet(M)*, aunque también se le atribuye la diseminación de resistencias a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas, kanamicina y mercurio (Rice, 2007; Roberts y Mullany, 2011).

El hallazgo de genes de resistencia a antibióticos idénticos en bacterias intestinales no relacionadas pone de manifiesto que la transferencia horizontal de genes entre los

microorganismos de la microbiota existe y en este intercambio genético los transposones conjugativos parecen desempeñar un papel fundamental (Scott, 2002). De hecho, existen estudios en los que se ha demostrado que la transferencia de transposones de la familia del Tn916/Tn1545 entre *E. faecalis* y *E. coli* es posible (Bertram *et al.*, 1991; Poyart *et al.*, 1995). Sin embargo, los transposones no sólo pueden ser los responsables de la transferencia de genes entre los microorganismos de la microbiota, sino también del intercambio de estos genes entre bacterias comensales y patógenas que transiten de forma temporal por el intestino, habiéndose demostrado, por ejemplo, la transferencia *in vitro* e *in vivo* del Tn1545 de *E. faecalis* a *Listeria monocytogenes*, viéndose además incrementada la tasa de transferencia de este transposón bajo la presión selectiva ejercida por la administración de tetraciclina a dosis bajas en el agua de bebida de los animales (Doucet-Populaire *et al.*, 1991).

1.3.2.3. Integrones

Los integrones son elementos genéticos de longitud variable que contienen una secuencia conservada que codifica para una enzima integrasa en su extremo 5' (gen *int*), genes de resistencia a antibióticos móviles denominados casetes o *cassettes* y un sitio específico de recombinación para la integración de esos genes casetes en el extremo 3' (*attI*) que es reconocido por la integrasa (Rice, 2007). Los integrones, a diferencia de los transposones, no poseen la información genética necesaria para codificar su propio traslado de unas bacterias a otras, aunque a menudo se encuentran asociados con transposones y/o plásmidos conjugativos que les sirven como vehículos para su transmisión (Ploy *et al.*, 2000).

Estos elementos genéticos móviles constituyen el mayor vector de multirresistencia en bacterias gram-negativas y por ello existen multitud de estudios epidemiológicos destinados a monitorizar su prevalencia y evolución (Cambray *et al.*, 2010).

Hasta el momento, en función de la secuencia de la integrasa, se han descrito cinco tipos diferentes de integrones asociados con la transferencia de genes de resistencia, aunque en los

microorganismos gram-negativos sólo se han identificado tres de estos tipos: integrones de clase 1, de clase 2 y de clase 3 (Rice, 2007; Cambray *et al.*, 2010).

Los **integrones de clase 1** son los que están más ampliamente distribuidos y, por tanto, son los más relevantes desde un punto de vista clínico. En estos integrones, la integrasa está codificada por el gen *intI1* y el segmento conservado del extremo 3' incluye 2 ORFs (marcos abiertos de lectura): *qacEΔ1*, que es una delección del gen *qacE* de resistencia a antisépticos derivados del amonio cuaternario y *sul1*, que codifica resistencia a sulfonamidas (Rice, 2007). Estos integrones están asociados con transposones derivados del Tn402, que a su vez puede estar incluido en transposones mayores como el Tn21 (Cambray *et al.*, 2010).

En los **integrones de clase 2** el gen que codifica la integrasa es el gen *int2*, que contiene una mutación sin sentido en el codón 179 que provoca que la proteína no sea funcional, por lo que su capacidad de recombinación está reducida. Estos integrones se asocian únicamente con los derivados del transposón Tn7 (Cambray *et al.*, 2010).

Por último, están los **integrones de clase 3**, que suelen ir asociados a transposones conjuntivos y que son poco frecuentes (Cambray *et al.*, 2010).

1.4. MECANISMOS DE ACCIÓN Y DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS.

1.4.1. ANTIMICROBIANOS POLIPEPTÍDICOS: POLIMIXINA E O COLISTINA.

La colistina pertenece al grupo de los antibióticos polipeptídicos o polimixinas. Este grupo de antibióticos está formado por cinco compuestos químicamente diferentes (polimixina A, B, C, D y E) (Falagas y Kasiakou, 2005; Landman *et al.*, 2008). La primera polimixina se descubrió en

el año 1947 a partir de una cepa de *Bacillus polymyxa* (Storm *et al.*, 1977), aunque la polimixina E o colistina no fue descubierta hasta el año 1949, año en el que se detectó este compuesto antimicrobiano en una cepa de *Bacillus polymyxa* subespecie *colistinus* Koyama (Falagas y Kasiakou, 2005). Inicialmente, la colistina se empleó con fines terapéuticos durante los años 50 para el tratamiento de diversas enfermedades en forma de colistimetato sódico, sin embargo, la aparición de efectos secundarios adversos como alergias, cuadros de nefrotoxicidad y neurotoxicidad e incluso parálisis respiratorias, hicieron que este antimicrobiano dejara de usarse en los años 80 (Falagas y Kasiakou, 2005; Arnold *et al.*, 2007; Landman *et al.*, 2008). No obstante, la emergente aparición de microorganismos gram-negativos patógenos multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacteriaceae* han provocado un reciente interés en el uso de este grupo de antimicrobianos, viéndose en ellos una posible alternativa terapéutica frente a estos patógenos, muchos de ellos implicados en graves infecciones nosocomiales (Falagas y Kasiakou, 2005; Li *et al.*, 2005; Landman *et al.*, 2008). Además, aunque siguen existiendo datos que apuntan a un cierto efecto neurotóxico y nefrotóxico de las polimixinas, recientes estudios parecen asegurar que tales efectos indeseados se producen en menor medida de lo que inicialmente se pensaba, incluso después de tratamientos parenterales prolongados (Stein y Raoult, 2002; Falagas *et al.*, 2005). En medicina veterinaria, la colistina se usa con frecuencia para prevenir y tratar los casos de diarrea post-destete en lechones causadas, entre otros agentes infecciosos, por *E. coli* (Mateu y Martin, 2000). Además, las polimixinas también suelen incluirse en formulaciones tópicas, principalmente de uso otológico y oftálmico.

Todos los antibióticos incluidos en este grupo son péptidos policatiónicos cíclicos que contienen un elevado porcentaje de ácido diaminobutírico y poseen una cadena de ácidos grasos unida a la parte peptídica a través de un enlace amida (Storm *et al.*, 1977; Falagas y Kasiakou, 2005). Estos antibióticos se consideran como antimicrobianos de amplio espectro, puesto que son eficaces contra microorganismos gram-positivos, levaduras, protozoos y microorganismos gram-negativos como *E. coli*, frente al que es especialmente potente, alcanzándose concentraciones mínimas inhibitorias inferiores a los 2µg/ml (Storm *et al.*, 1977).

Además, su acción depende principalmente de la dosis administrada, siendo agentes bacteriostáticos a bajas concentraciones y biocidas a concentraciones mayores.

El principal mecanismo de acción de estos antibióticos se basa en la disrupción de la estructura de la membrana bacteriana. Debido al carácter anfipático de estos compuestos, se ha comparado su acción con la de los detergentes catiónicos. Sin embargo, la capacidad biostática o biocida de estos antimicrobianos es más elevada que la de los detergentes catiónicos y se desarrolla a concentraciones mucho más bajas, lo que sugiere que la acción de los antibióticos polipeptídicos sobre las membranas bacterianas es más compleja que la de los detergentes catiónicos (Storm *et al.*, 1977). Parece que en los organismos gram-negativos como *E. coli*, las polimixinas actúan también sobre la membrana externa bacteriana, lo que puede provocar una alteración indirecta sobre la permeabilidad de la membrana interna citoplasmática o bien facilitar directamente la interacción entre el compuesto polipeptídico y la membrana citoplasmática (Storm *et al.*, 1977). Aunque actualmente no está totalmente aclarado el modo en que estos antibióticos interactúan con las membranas, parece que la cadena de ácidos grasos que forma parte de su estructura penetra dentro de la región hidrofóbica de la membrana. De este modo, los grupos amonio interaccionan con los lipopolisacáridos y fosfolípidos de la membrana provocando un desplazamiento competitivo de los cationes divalentes de calcio y magnesio de los grupos fosfato de los fosfolípidos cargados negativamente. Estos fenómenos alterarían gravemente la estructura de la membrana, provocando un incremento en la permeabilidad de la misma que finalmente conduciría a la muerte de la célula bacteriana (Storm *et al.*, 1977; Mascaretti, 2003a; Landman *et al.*, 2008). Estudios más recientes indican que el elemento con el que parecen interaccionan estos antibióticos en la superficie externa de la bacteria es el lípido A de los lipopolisacáridos (Tran, *et al.*, 2005). Además, el efecto disruptivo que las polimixinas ejercen sobre la integridad de la membrana parece provocar una mayor susceptibilidad de las bacterias gram-negativas a los antimicrobianos hidrofóbicos, teniendo un efecto sinérgico la administración conjunta de polimixinas y este tipo de antibióticos como los macrólidos (Landman *et al.*, 2008).

Al administrar la concentración mínima de polimixina capaz de provocar un efecto biocida, la permeabilidad de la membrana para compuestos de bajo peso molecular se ve incrementada rápidamente y se produce una liberación al medio de los componentes citoplasmáticos de la

bacteria. Dentro de los compuestos liberados al medio se encuentran la adenina, la adenosina, la guanina y la guanosina. La liberación de estos compuestos ocurre rápidamente y está directamente relacionada con la dosis del antibiótico polipeptídico administrada (Storm *et al.*, 1977). Sin embargo, la acción de las polimixinas no se ciñe únicamente a la alteración de la permeabilidad de la membrana, ya que también pueden provocar alteraciones en la respiración bacteriana, en mecanismos de transporte, en las concentraciones de ATP, en la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, lipopolisacáridos y peptidoglicanos y en la actividad de algunas enzimas (Storm *et al.*, 1977).

Las **resistencias intrínsecas** frente a los antibióticos polipeptídicos están relacionadas con **modificaciones en el lípido A**, compuesto fosfolipídico que forma parte de los lipopolisacáridos de la membrana externa de los gram-negativos (Tran *et al.*, 2005a; Landman *et al.*, 2008). Las **resistencias adquiridas** se han observado en *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*. En este caso, la susceptibilidad frente a polimixinas se reduce a través de la **sustitución de grupos fosfato en los lipopolisacáridos de la membrana** (Landman *et al.*, 2008). De esta forma, en *E. coli* las resistencias a polimixinas suelen producirse por la modificación del lípido A por la unión a este compuesto del azúcar 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) y la fosfoetanolamina (pEtN) (Tran *et al.*, 2005a; Landman *et al.*, 2008). Esta unión provocaría un cambio en la carga eléctrica de los grupos fosfato del lípido A, que quedarían enmascarados con grupos amino cargados positivamente, provocando un detrimento en la unión del antibiótico a las membranas bacterianas. Este fenotipo resistente parece estar bajo el control del sistema regulador PmrA/PmrB, cuya activación se ve favorecida durante el crecimiento bacteriano con pH bajos, niveles elevados de hierro y niveles bajos de magnesio. Sin embargo, parece que cuando la activación del sistema se favorece por un descenso en los niveles del ión magnesio, es el sistema PhoP/PhoQ el que de forma indirecta conduciría a una activación del otro sistema regulador PmrA/PmrB dando lugar de igual forma a cepas resistentes a los antibióticos polipeptídicos (Tran, *et al.*, 2005).

1.4.2. ANTIMICROBIANOS β -LACTÁMICOS: AMOXICILINA.

La amoxicilina es una aminopenicilina de amplio espectro que pertenece al grupo de antimicrobianos denominados β -lactámicos. En este grupo se incluyen cinco grandes grupos de antibióticos: las penicilinas, las cefalosporinas, los antimicrobianos carbapenémicos, los monobactámicos y los antimicrobianos inhibidores de las β -lactamasas (Marin y Gudíol, 2003). Estos antibióticos fueron los primeros en emplearse de forma clínica, remontándose su uso a los años cuarenta. Su diana de acción es la pared celular existente tanto en microorganismos gram-positivos como gram-negativos y que está compuesta mayoritariamente por peptidoglicanos. Para llevar a cabo la formación de dicha pared celular se requieren tres fases: la fase citoplasmática, que consiste en la síntesis en el citoplasma de la unidad estructural del peptidoglicano (el UDP-N-acetil-muramyl-pentapéptido), la fase asociada a la membrana, durante la cual el muramyl pentapéptido se polimeriza y se fija a la membrana citoplasmática para después ser transportado a la cara externa de esta membrana a través de dos intermediarios lipídicos, y la fase extracitoplasmática, donde las hebras de glicanos y péptidos que forman el muramyl pentapéptido se entrecruzan a través de enzimas transglicosasas y transpeptidasas asociadas a la membrana. Cuando la bacteria está sometida al efecto de los antibióticos β -lactámicos, se produce una inhibición de la fase extracitoplasmática, ya que estos antimicrobianos bloquean la transpeptidación de las hebras del peptidoglicano al unirse covalentemente a las enzimas transpeptidasas de la pared celular, más conocidas como proteínas de unión a penicilinas (PBPs o *penicillin-binding proteins*) lo que conduce, en última instancia, a la lisis y muerte celular (Guardabassi y Courvalin, 2006).

Aunque la estructura química de los múltiples antibióticos β -lactámicos naturales y semisintéticos que existen en la actualidad es diferente según la cadena lateral que presentan en la posición 6, todos ellos comparten una estructura química común que consiste en un núcleo que es el ácido 6-aminopenicilánico y que está formado por un anillo β -lactámico unido a un anillo tiazolidínico (Yao, 2007).

Los antibióticos incluidos en el grupo de los β -lactámicos son antibióticos de amplio espectro y se distribuyen bien por todos los compartimentos corporales y, por ello, son antibióticos muy

utilizados tanto en medicina humana como en veterinaria. Su acción es bactericida y, según los principios farmacodinámicos, depende más del tiempo de administración que de la dosis administrada (Gould y MacKenzie, 2002; Yao, 2007).

Los microorganismos gram-negativos como *E. coli* poseen **resistencia intrínseca** a ciertos β -lactámicos al estar en ellos reducida la permeabilidad a estos antibióticos por la pérdida o modificación de las porinas de la membrana externa bacteriana (García, 1999; Marin y Gudiol, 2003). También está descrita la resistencia a estos antibióticos a través de mecanismos de **bombas de flujo** (Llarrull *et al.*, 2010). Sin embargo, en la actualidad, el principal mecanismo de resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos en *E. coli* y en la mayoría de las bacterias se basa en la **producción de β -lactamasas**, enzimas capaces de hidrolizar la unión peptídica del anillo β -lactámico e inactivar así al antimicrobiano (Briñas *et al.*, 2002; Mascaretti, 2003b). La síntesis de estas enzimas puede estar codificada por genes cromosómicos o plasmídicos (Mascaretti, 2003b). Actualmente, se conocen más de 300 β -lactamasas. El hecho de que se estén detectando continuamente nuevas β -lactamasas hace complicada su clasificación y para ello se han propuesto diferentes sistemas basados en su función (principalmente perfil de sustrato y sensibilidad a inhibidores), en sus propiedades físicas (como el punto isoelectrico o el peso molecular) o en su localización genética (plasmídica o cromosómica) (Mascaretti, 2003b). La primera clasificación se hizo en el año 1970 por Jack y Richmond y fue ampliada en el año 1973 por Richmond y Sykes, quienes clasificaron las β -lactamasas de los gram-negativos en cinco clases en función de su perfil de sustrato (Mascaretti, 2003b). Sin embargo, esta clasificación fue modificada en varias ocasiones, primero por Sykes y Mathew (en 1976), posteriormente por Bush (Bush, 1989b; Bush, 1989a) y más recientemente por Bush *et al.* (1995) quienes clasificaron estas enzimas de acuerdo a su sustrato o espectro de acción y a su perfil de inhibición. En 1980, Ambler propuso la primera clasificación de las β -lactamasas en función de su estructura y de su secuencia aminoacídica, quedando clasificadas las enzimas según este criterio en cuatro clases: A, B, C, y D (Ambler, 1980). Según este criterio, las β -lactamasas de clase A (serin-penicilasas), C (serin-cefalosporinasas) y D (serin-oxacilinasas) serían aquellas que tienen serina en el sitio activo, mientras que las de clase B serían metaloproteínas que contienen al menos un ión de Zn^{2+} por cada subunidad activa (Ambler, 1980; Mascaretti, 2003b).

- β -lactamasas de clase A

Dentro de este grupo se incluyen las β -lactamasas más numerosas y ampliamente distribuidas, encontrándose tanto en microorganismos gram-negativos como gram-positivos. A este grupo pertenecen las β -lactamasas **TEM-1** de *E. coli*, **SHV-1** de *Klebsiella pneumoniae* y **PER-1** de *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras. También se clasifican dentro de este grupo las conocidas como **β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)** también denominadas ESBL (del inglés *Extended-Spectrum Beta-Lactamase*). Las BLEE proceden de genes codificadores de TEM y SHV que al sufrir mutaciones puntuales dan lugar a estas enzimas que, además de hidrolizar penicilinas, también son capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera y cuarta generación como la cefuroxima y la ceftazidima. Fueron descritas por primera vez en 2002 y entre ellas destacan la familia de β -lactamasas **CTX-M** (Bauernfeind *et al.*, 1996; Mascaretti, 2003b).

- β -lactamasas de clase C

Esta clase de β -lactamasas son las segundas más ampliamente distribuidas por detrás de las de clase A. Tienen una localización cromosómica o plasmídica y son producidas por bacterias gram-negativas como *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, etc. Son β -lactamasas capaces de hidrolizar multitud de β -lactámicos entre los que se encuentran las cefalosporinas de amplio espectro (Mascaretti, 2003b). Dentro de este grupo se incluyen las enzimas AmpC, importantes cefalosporinasas que son codificadas por numerosas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Jacoby, 2009). Los genes ampC a su vez codifican numerosos tipos de enzimas β -lactamasas como **MIR-1**, **CMY-1**, **CMY-2**, **FOX-1**, etc (Mascaretti, 2003b). El cromosoma de *E. coli* contiene un gen *ampC* no inducible. La expresión de este gen suele ser muy baja debido a que tiene un promotor muy débil. Sin embargo, se han descrito mutaciones en la región de ese promotor capaces de causar un incremento en la producción de enzimas AmpC que causarían resistencia a penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos (Caroff *et al.*, 1999; Caroff *et al.*, 2000).

- β -lactamasas de clase D

A estas enzimas se las conoce también como las serin-oxacilinasas, ya que todas las β -lactamasas capaces de hidrolizar la oxacilina pertenecen a este grupo. Dentro de las β -lactamasas de clase D se incluyen todas las β -lactamasas tipo **OXA**, enzimas ampliamente distribuidas que han sido detectadas en muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y en *Pseudomonas aeruginosa* (Mascaretti, 2003b).

- β -lactamasas de clase B o metalo- β -lactamasas

Estas enzimas se producen como enzimas periplásmicas o extracelulares por las bacterias y requieren de zinc y de factores coenzimáticos para llevar a cabo la hidrólisis de la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. Confieren resistencia al ácido clavulánico, aunque son susceptibles a la inhibición por quelantes de iones divalentes como el EDTA. Estas enzimas se pueden encontrar tanto en gram-negativos como en gram-positivos (Nordmann y Poirel, 2002). Dentro de este grupo se encuentran las familias de β -lactamasas **IMP** y **VIM**, enzimas que cada vez se detectan con mayor frecuencia y que constituyen un motivo de preocupación desde el punto de vista sanitario, ya que son capaces de incrementar considerablemente el nivel de resistencia a β -lactámicos en bacterias que poseen de forma natural o adquirida baja permeabilidad de su membrana externa a estos antibióticos, lo que limita las opciones terapéuticas y conduce al fracaso en el tratamiento de las infecciones causadas por esos microorganismos (Nordmann y Poirel, 2002).

En *Escherichia coli* las β -lactamasas que se han detectado con mayor frecuencia en los últimos años han sido las de clase A y dentro de estas, las del tipo TEM (Briñas *et al.*, 2002; Kaye *et al.*, 2004). Dado que las BLEE proceden de este tipo de β -lactamasas, la elevada frecuencia de detección de estas enzimas en *E. coli* es motivo de preocupación y ya se han detectado BLEEs en cepas patógenas de *E. coli* de origen humano y animal e incluso en cepas no patógenas de la microbiota intestinal de animales de producción sanos, lo que podría representar un grave problema de salud pública y de seguridad alimentaria (Goncalves *et al.*, 2010).

1.4.3. TETRACICLINAS: DOXICICLINA

La doxiciclina pertenece al grupo de las tetraciclinas, antimicrobianos descritos por primera vez a finales de 1940. Estos compuestos actúan como agentes bacteriostáticos capaces de inhibir la síntesis proteica bacteriana al unirse de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma e impedir la unión del aminoacil-ARNt con su receptor. Son considerados como antibióticos de amplio espectro, ya que son activos frente a un elevado número de microorganismos gram-positivos, gram-negativos, micoplasmas, clamidias, rickettsias y algunos protozoos (Mascaretti, 2003d) . Las tetraciclinas se clasifican en tres grupos dependiendo del tiempo que dure su acción. De esta forma, la clortetraciclina, la tetraciclina y la oxitetraciclina son consideradas como fármacos de acción corta, la demeclociclina y la metaciclina tienen una duración de acción intermedia y la doxiciclina y la minociclina serían de acción prolongada (Yao, 2007). Estos antimicrobianos se emplean con frecuencia en medicina humana y veterinaria, aunque el aumento de resistencias que se ha producido frente a ellos en los últimos años ha limitado su utilidad terapéutica (Lemos, 2003). En algunos países como Estados Unidos las tetraciclinas también se han empleado como promotores del crecimiento en animales de abasto siendo administradas a dosis subterapéuticas (Chopra y Roberts, 2001).

La doxiciclina es un antibiótico semisintético que se describió por primera vez en 1967, por lo que se incluye dentro de las tetraciclinas de segunda generación, grupo que engloba las tetraciclinas descritas entre 1965 y 1972. La estructura química de la 6-deoxi-5-hidroxitetraciclina o doxiciclina, consiste en un núcleo tetracíclico lineal, común para todas las tetraciclinas, en el que se adiciona un grupo hidroxilo en el carbono 5 y se suprime otro grupo hidroxilo en el carbono 6.

Para que la doxiciclina se una al ribosoma y ejerza su acción debe atravesar la membrana externa y la citoplasmática de los microorganismos gram-negativos como *Escherichia coli*. La membrana externa se atraviesa a través de las porinas y, más tarde, el compuesto químico se disocia, permitiendo así que la fracción lipofílica atravesase la membrana citoplasmática. La

unión del compuesto al ribosoma es reversible, lo que explica el efecto bacteriostático de estos antimicrobianos.

La administración de tetraciclinas y polimixinas como la colistina posee un efecto sinérgico, ya que la acción de estas últimas sobre la permeabilidad de la membrana favorece la incorporación de las tetraciclinas por parte de la célula bacteriana (Lemos, 2003).

Las resistencias a tetraciclinas están relacionadas con la adquisición de **genes *tet***. Se han descrito un total de **38 genes *tet*** que codifican diferentes mecanismos de resistencia, de los cuales 23 codifican bombas de flujo capaces de expulsar las tetraciclinas fuera de la célula bacteriana, 11 codifican proteínas que protegen la diana de acción en el ribosoma (Chopra y Roberts, 2001; Roberts, 2005) y otros tres codifican enzimas capaces de alterar la estructura química del antibiótico. Además de estos genes, recientemente se ha descrito el gen *tet(U)*, localizado en un plásmido de *Enterococcus faecium*, cuya función aún se desconoce (Chopra y Roberts, 2001). Muchos de estos genes se localizan en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones, lo que facilita enormemente su diseminación entre las especies bacterianas (Lemos, 2003).

Los **genes *tet* que codifican bombas de flujo** son los más frecuentes ya que representan el 60% del total de los genes de resistencia a tetraciclinas descritos hasta el momento. Estos genes son los siguientes: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tetA(P)*, *tet(V)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, *tet(31)*, *tet(33)*, *tet(35)*, *tet(38)*, *tet(39)*, *tcr3*, *otr(B)* y *otr(C)*. Todos ellos codifican proteínas asociadas a membrana capaces de exportar el antibiótico fuera de la bacteria a través de mecanismos dependientes de energía y son los genes que suelen estar implicados en la resistencia a tetraciclinas en la mayoría de las bacterias gram-negativas (Roberts, 2005).

Los 11 genes que codifican **resistencia a tetraciclinas a través de la protección de la diana de acción ribosómica** son: *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(T)*, *tetB(P)*, *tet(Q)*, *tet(W)*, *tet(32)*, *tet(36)*, *tet* y *otr(A)*. Aunque el mecanismo por el cual estas proteínas interaccionan con el ribosoma bacteriano protegiéndolo de la acción de las tetraciclinas aún no se conoce con certeza, parece que podrían interaccionar con la proteína h34 del ribosoma provocando la disrupción alostérica del lugar de unión de la tetraciclina en el ribosoma (Roberts, 2005).

El mecanismo de resistencia basado en la **hidrólisis enzimática del antibiótico** está codificado por tres genes: *tet(X)*, descrito en el género *Bacteroides* y que codifica una enzima oxidoreductasa dependiente de NADPH, *tet(34)*, que codifica una enzima similar a la xantina-guanina fosforibosil transferasa encontrada en *Vibrio cholerae* y *tet(37)*, detectado en el metagenoma oral humano, aunque aún no se ha identificado a un género bacteriano específico que sea portador de este gen (Speer *et al.*, 1991; Roberts, 2005).

1.4.4. AMINOGLUCÓSIDOS: GENTAMICINA

El primer antibiótico perteneciente al grupo de los aminoglucósidos se describió en el año 1943 y, desde entonces, este grupo de antibióticos ha sido crucial en el tratamiento de infecciones causadas principalmente por microorganismos gram-negativos. Los aminoglucósidos de los que se dispone en la actualidad derivan de *Micromonospora spp.* (gentamicina, sisomicina y netilmicina) o de *Streptomyces spp.* (estreptomicina, neomicina, kanamicina, tobramicina y paromomicina) (Yao, 2007). Todos los antibióticos englobados en este grupo se caracterizan por tener una potente actividad bactericida que se desarrolla de forma rápida y tiende a mantenerse incluso cuando ha cesado la administración del fármaco (Mascaretti, 2003d). Esta actividad bactericida se desarrolla eficazmente administrando dosis terapéuticas y la destrucción del microorganismo es más rápida cuanto mayor es la concentración del antimicrobiano (Lemos, 2003). El espectro de acción de estos antibióticos incluye un gran número de especies gram-negativas, algunos estafilococos y micobacterias. La

estructura química fundamental de los aminoglucósidos consiste en un anillo aminociclitol al cual se unen dos o más azúcares, con o sin grupo amino, por medio de enlaces glucosídicos u oxídicos (Mascaretti, 2003d).

El mecanismo de acción de los aminoglucósidos se basa en la inhibición de la síntesis proteica de la bacteria, inhibición que logran uniéndose de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, lo que provoca una lectura errónea de la secuencia genética del ARNm que ha de transformarse en secuencia aminoacídica, conduciendo a la muerte celular (Lemos, 2003; Yao, 2007).

Para llegar hasta su diana de acción, los aminoglucósidos deben atravesar la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Esto se logra gracias al carácter policatiónico que poseen estos antimicrobianos, lo que les permite interaccionar con los compuestos aniónicos de la membrana externa, tales como los fosfolípidos y lipopolisacáridos, desplazando con ello de forma competitiva a iones divalentes de la membrana como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} . Estos iones desplazados tienden a unirse a lipopolisacáridos adyacentes y con ello se modifica la permeabilidad de la membrana, favoreciendo la penetración del fármaco al interior de la bacteria (García de Lomas *et al.*, 1999). Por este mismo motivo, los compuestos capaces de inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, como los β -lactámicos y la vancomicina, incrementan la entrada del aminoglucósido al interior de la bacteria, provocándose un efecto sinérgico entre estos antibióticos (Yao, 2007). Igualmente, es posible que los antibióticos que ejercen un efecto destructivo sobre la membrana bacteriana, como los antibióticos polipeptídicos (por ejemplo la colistina) tengan también un efecto sinérgico al combinarlos con los aminoglucósidos y que entre estos dos grupos de antibióticos puedan darse también fenómenos de resistencia cruzada.

Existen tres mecanismos descritos capaces de conferir resistencia frente a los antibióticos aminoglucósidos: **inactivación enzimática** del compuesto farmacológico, **disminución de la captación y/o acumulación del antibiótico** en la bacteria y **mutaciones cromosómicas** que

provocan cambios a nivel ribosómico que conducen a una menor afinidad del compuesto por su diana de acción (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001; Mascaretti, 2003d).

De esta forma, se sabe que en *E. coli* la **bomba de flujo AcrD** captura los aminoglucósidos tanto del espacio periplásmico como del citoplasmático bombeándolos hacia el exterior de la célula y disminuyendo así la acción de estos antibióticos al disminuir su concentración intracelular (Yao, 2007). En esta especie bacteriana también se han descrito modificaciones en el potencial eléctrico de los grupos fosfato de los lipopolisacáridos de la membrana como mecanismo de resistencia a aminoglucósidos al dificultar la entrada del antibiótico al interior de la célula bacteriana (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001).

La resistencia a aminoglucósidos debida a **modificaciones del ribosoma** se logra a través de mutaciones en el sitio de unión de estos antibióticos a la subunidad ribosómica. Estas mutaciones pueden conducir a cambios en las proteínas ribosómicas y en el ARNr 16S, así como a metilaciones enzimáticas del ARNr. Además, recientemente se han descrito nuevas metilasas del ARNr 16S (RmtA, RmtB y ArmA) en microorganismos gram-negativos que se han considerado como un problema de resistencia a aminoglucósidos emergente (Yao, 2007).

Sin embargo, el mecanismo de resistencia a aminoglucósidos más importante, por ser el más frecuente y el que confiere mayores niveles de resistencia, consiste en la **producción de enzimas capaces de alterar la estructura química del antibiótico**. Estas enzimas se clasifican en tres tipos: las **N-acetiltransferasas**, denominadas **AAC**, las **O-nucleotidiltransferasas** (principalmente adeniltransferasas) denominadas **ANT** y las **O-fosfotransferasas**, conocidas como **APH** (Mascaretti, 2003d). Cada clase (AAC, ANT o APH) va seguida de un número entre paréntesis que indica la posición en la que se produce la transferencia del grupo químico y de una numeración romana que permite diferenciar entre los distintos tipos de enzimas pertenecientes a cada clase (Mascaretti, 2003d). Actualmente, se conocen cuatro grupos de enzimas acetiltransferasas: AAC(1), AAC(3), AAC(2') y AAC(6'). Dentro de esta clase, se han descrito un total de 16 enzimas diferentes, la mayoría de las cuales se encuentran en organismos gram-negativos (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001). De todas ellas, la AAC(3), la AAC(2') y la AAC(6') suelen estar relacionadas con resistencias frente a gentamicina y son los

genes *aac(3)-IIa* y *aac(3)-Ia* los que suelen detectarse en organismos gram-negativos (Sandvang y Aarestrup, 2000; Mascaretti, 2003d). Las nucleotidiltransferasas se dividen en 5 grupos: ANT(6), ANT(9), ANT(4'), ANT(2'') y ANT(3'') y de todas ellas, la codificada por el gen *ant(2'')-Ia* es la enzima que con mayor frecuencia da lugar a aislados de *Escherichia coli* resistentes a gentamicina (Sandvang y Aarestrup, 2000).

Existen un total de 11 variantes de las enzimas fosfotransferasas divididas en 7 grupos: APH(3'), APH(2''), APH(3''), APH(6), APH(9), APH(4) y APH(7'') (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001; Yao, 2007), aunque de todas ellas, sólo la APH(2'') parece estar relacionada con la aparición de resistencias a gentamicina (Mascaretti, 2003d).

También se ha descrito una enzima modificadora de aminoglucósidos bifuncional (AAC(6)-APH(2'')) que es capaz de acetilar y fosforilar al antibiótico. Esta enzima se ha detectado en los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* y es responsable de elevados niveles de resistencia a aminoglucósidos (Yao, 2007).

Los genes que codifican para todas estas enzimas, suelen encontrarse en elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones o integrones, lo que favorece su transmisión horizontal enormemente (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001). De hecho, el gen *aac(6')-aph(2'')* que codifica para la enzima modificadora de aminoglucósidos bifuncional, descrita anteriormente, se ha detectado en el transposón Tn4001-like insertado tanto en el ADN cromosómico como en el ADN plasmídico de las cepas resistentes a aminoglucósidos en las que se identificó este gen (Yao, 2007).

1.4.5. QUINOLONAS: ENROFLOXACINA

Las quinolonas forman un grupo de potentes antibióticos químicamente relacionados que derivan del ácido 7-cloro-1-etil-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolinecarboxílico y que son ampliamente utilizados tanto en medicina humana como veterinaria (Mascaretti, 2003c). El hallazgo del ácido 7-cloro-1-etil-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolinecarboxílico, considerado como la primera quinolona, fue algo casual, ya que se trata de un producto químico formado durante la síntesis de un fármaco empleado contra la malaria denominado cloraquina. La actividad antibacteriana de este compuesto resultó ser muy limitada y, por ello, rápidamente se comenzaron a sintetizar compuestos análogos con mayor poder antimicrobiano. Así, en el año 1962 se describió el ácido nalidíxico, que se convirtió en la primera quinolona comercializada y cuyo uso se autorizó para el tratamiento de infecciones urinarias en el año 1964 (Mascaretti, 2003c). El espectro de acción de este compuesto seguía siendo escaso, siendo eficaz únicamente frente a bacterias gram-negativas (concretamente frente al género *Enterobacteriaceae*). Además, sus propiedades farmacocinéticas no eran las deseadas, ya que los niveles en sangre del fármaco eran muy bajos, lo que limitaba mucho su uso clínico en enfermedades sistémicas (Mascaretti, 2003c). Estas características, junto con la rápida aparición de aislados bacterianos resistentes al ácido nalidíxico, fomentaron la necesidad de seguir sintetizando nuevos compuestos, de tal manera que, poco después de la aparición de la primera quinolona comercializada, se patentaron nuevos fármacos como la cinoxacina y el ácido pipemídico, incluidos actualmente junto con el ácido nalidíxico en el grupo de las **quinolonas de primera generación** (Mascaretti, 2003c).

En el año 1973 se comenzaron a sintetizar las primeras fluoroquinolonas al introducir un átomo de flúor en la posición 6 de la molécula de la que derivan todas las quinolonas (el ácido 7-cloro-1-etil-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolinecarboxílico). Esta modificación permitió ampliar el espectro de acción de este grupo de antimicrobianos a las bacterias gram-negativas y gram-positivas y mejorar las características farmacocinéticas al aumentar la liposolubilidad de los compuestos químicos sintetizados (Lees y Shojaee AliAbadi, 2003; Martinez *et al.*, 2006). La primera fluoroquinolona patentada fue la flumequina (año 1973) y poco después se sintetizó el

norfloxacin, patentado en 1978 (Mascaretti, 2003c). Desde ese momento, y hasta el año 1982, fueron muchas las fluoroquinolonas sintetizadas y a todas ellas se las engloba dentro del grupo de las **quinolonas de segunda generación**, que se caracterizan químicamente por tener un átomo de flúor en la posición 6 del anillo quinolónico así como un grupo carboxilo en el carbono 3 (C-3), un grupo ceto en el C-4 y una molécula de piperacina o metilpiperacina en el C-7 (Mascaretti, 2003c). Dentro de este grupo se encuentran el ciprofloxacino y el norfloxacino entre otros (Yao, 2007).

Las **quinolonas de tercera generación**, grupo en el que se encuentra la enrofloxacin, se empezaron a sintetizar en los años 90. Estas fluoroquinolonas poseen características químicas similares a las de segunda generación, pero poseen mayor actividad contra microorganismos gram-positivos como *Streptococcus pneumoniae* y son incluso eficaces frente a microorganismos anaerobios (Mascaretti, 2003c). Dentro de este grupo se incluyen, además de la enrofloxacin, la esparfloxacina y la levofloxacina, así como dos compuestos empleados de forma exclusiva en medicina veterinaria como son el marbofloxacino y el recientemente sintetizado pradofloxacino (Silley *et al.*, 2007).

Actualmente, las fluoroquinolonas son probablemente el grupo de antimicrobianos que está evolucionando más rápidamente, sintetizándose gran cantidad de moléculas novedosas que prometen mayor espectro de acción y menor riesgo de aparición de resistencias. De esta forma, las **quinolonas de cuarta generación**, cuya síntesis se ha producido en los últimos años, poseen un espectro de acción que incluye bacterias aerobias gram-negativas y algunos microorganismos gram-positivos, teniendo una actividad limitada frente a los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* y frente a bacterias anaerobias estrictas, demostrando una potencia frente a los microorganismos susceptibles de dos a ocho veces superior a la de las quinolonas de segunda generación (Lees y Shojaee AliAbadi, 2003; Yao, 2007). Dentro de este grupo se incluyen antibióticos como la gatifloxacina y la moxifloxacina (Kowalski *et al.*, 2003; Yao, 2007).

Las quinolonas son antibióticos con un efecto bactericida que se inicia rápidamente tras penetrar el compuesto en la célula bacteriana a través de las porinas y atravesar después la membrana citoplasmática para alcanzar su diana de acción, el ADN bacteriano. Este efecto depende más de la concentración de fármaco administrada que del tiempo de exposición (Lees y Shojaee AliAbadi, 2003). De esta forma, un incremento en la concentración debería conducir, en principio, a un incremento en la actividad bactericida hasta alcanzar un nivel máximo definido como concentración bactericida óptima. Esto significa que la concentración máxima de quinolona (C_{\max}) alcanzada tras la administración del fármaco influye en el efecto que tiene el antibiótico y en el hecho de que aparezca un buen efecto post-antibiótico (Hooper, 2001; Martinez *et al.*, 2006; Drlica *et al.*, 2008).

El mecanismo de acción de las quinolonas se basa en bloquear la síntesis del ADN bacteriano, llegando incluso a inhibir también la síntesis de ARN a elevadas concentraciones (Hooper, 2001). Para comprender el mecanismo de acción de las quinolonas, debe recordarse que el cromosoma bacteriano está formado por una doble hebra de ADN que se mantiene en un estado de superenrollamiento negativo alrededor de un centro de ARN. Durante la replicación y la transcripción, esta doble hebra debe desenrollarse para permitir la síntesis de la nueva molécula de ADN o de ARNm. Para ello, resultan imprescindibles dos enzimas que son las dianas de acción de las quinolonas: la **topoisomerasa II o ADN girasa** y la **topoisomerasa IV**. La ADN girasa está formada por cuatro subunidades proteicas: **dos subunidades A o GyrA** y **dos subunidades B o GyrB**, codificadas por los genes ***gyrA*** y ***gyrB*** respectivamente. La función de esta enzima consiste en desenrollar la doble hebra de ADN a nivel de la horquilla de replicación y promover de nuevo el sellado, plegamiento y enrollamiento de las hebras de ADN tras la replicación. Por otra parte, la topoisomerasa IV posee también una estructura tetramérica formada por **dos subunidades proteicas C o ParC** y **dos subunidades E o ParE** codificadas respectivamente por los genes ***parC*** y ***parE***. La función de esta enzima es hacer posible la separación del ADN cromosómico (decadenación) entre las dos células hijas al final del proceso de replicación (Lees y Shojaee AliAbadi, 2003; Mascaretti, 2003c; Guardabassi y Courvalin, 2006).

Por tanto, las quinolonas tienen dos dianas de acción: la ADN girasa o topoisomerasa II y la topoisomerasa IV. El hecho de que una quinolona actúe sobre una u otra diana de acción depende del tipo de microorganismo contra el que esté actuando. De esta forma, la ADN girasa es la principal diana de acción de las quinolonas en las bacterias gram-negativas, mientras que la topoisomerasa IV es el lugar de acción principal en las gram-positivas (Guardabassi y Courvalin, 2006; Yao, 2007).

La **resistencia a quinolonas** se debe principalmente a la aparición de mutaciones que alteran las subunidades de las topoisomerasas II y IV. Sin embargo, recientemente también se han descrito otros mecanismos de resistencia mediados por genes fácilmente transferibles como la acción de bombas de flujo, la disminución en la entrada del antibiótico a la célula bacteriana por la alteración en la expresión de las porinas, modificaciones enzimáticas del antibiótico y protección de la diana de acción de las quinolonas (Martinez-Martinez *et al.*, 1998; Mascaretti, 2003c; Mammeri *et al.*, 2005; Robicsek *et al.*, 2006a; Yamane *et al.*, 2007).

El principal mecanismo de resistencia a quinolonas en el género *Enterobacteriaceae* se debe a **mutaciones puntuales en las topoisomerasas**. Estas mutaciones que dan lugar a cepas resistentes a quinolonas se producen en regiones específicas de los genes que codifican para las subunidades de las topoisomerasas y que son conocidas como región **QRDR** (acrónimo del inglés “**quinolone resistance-determining region**”). Tales mutaciones en la región QRDR dan lugar a variaciones en los aminoácidos de las enzimas topoisomerasas que conducen a una menor afinidad de la quinolona por su lugar de unión, dando lugar así a cepas bacterianas resistentes (Hooper, 1999). En bacterias gram-positivas, el desarrollo de aislados resistentes suele deberse a modificaciones en la topoisomerasa IV, debidas principalmente a mutaciones en el gen *parC* y, con menor frecuencia, en el gen *parE* (Hooper, 2001; Mascaretti, 2003c). Sin embargo, en las bacterias gram-negativas como *E. coli*, las resistencias aparecen principalmente como consecuencia de mutaciones en el gen *gyrA* de la ADN girasa o topoisomerasa II, así como en el gen *parC* de la topoisomerasa IV (Hooper, 2001; Mascaretti, 2003c). Las mutaciones en los genes *gyrB* y *parE* suelen ser menos frecuentes (Everett *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2004; Hopkins *et al.*, 2005). Es importante señalar que las mutaciones que se

producen únicamente en la diana de acción secundaria (*gyrB* y *parE* en el caso de *E. coli*) no son capaces de provocar la aparición de fenotipos resistentes o, si lo hacen, el nivel de resistencia de esos aislados suele ser muy bajo (Hooper, 2001).

Otro mecanismo de resistencia desarrollado frente a quinolonas consiste en la disminución de la concentración intracelular del antimicrobiano a través de **alteraciones en la expresión de proteínas de la membrana externa** como OmpF, importante porina implicada en la entrada de estos antibióticos al interior de la célula bacteriana (Mascaretti, 2003c). Sin embargo, más relevante que este mecanismo de resistencia parece ser el descrito recientemente en *E. coli* y que consiste en la disminución de la concentración del antibiótico en la bacteria por la expulsión del mismo a través de **bombas de flujo específicas** mediadas por el **gen *qepA*** de localización plasmídica (Yamane *et al.*, 2007). Por sí solas, las bombas de flujo parecen conferir niveles bajos de resistencia a quinolonas, sin embargo, su expresión puede amplificar el nivel de resistencia adquirido a través de mutaciones en la región QRDR de las topoisomerasas (Yao, 2007).

Recientemente, también se ha demostrado la aparición de resistencias a quinolonas en enterobacterias como *E. coli* mediadas por **plásmidos portadores de genes *qnr*** que codifican proteínas Qnr capaces de unirse a la ADN girasa y la topoisomerasa IV sin alterar la función de estas enzimas y protegiéndolas de la acción de las quinolonas (Tran *et al.*, 2005c; Tran *et al.*, 2005b). Hasta el momento, en el género *Enterobacteriaceae* se han descrito los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS* (Jacoby *et al.*, 2006; Cavaco y Aarestrup, 2009; Cavaco *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009). En general, a través de la expresión de estos genes sólo se logran niveles bajos de resistencia a quinolonas, pero la presencia de estos genes junto con otros mecanismos de resistencia a quinolonas, como las mutaciones en las topoisomerasas, puede dar lugar a la aparición emergente de cepas altamente resistentes a quinolonas (Mammeri *et al.*, 2005; Robicsek *et al.*, 2006b; Yao, 2007).

Por último, en el año 2006, Robicsek *et al.* descubrieron un nuevo mecanismo de resistencia a quinolonas mediado por el gen ***aac(6')Ib*** que codifica una aminoglucósido acetiltransferasa

capaz de modificar la estructura química de quinolonas como el ciprofloxacino y el norfloxacino (Robicsek *et al.*, 2006a).

2-OBJETIVOS

Las resistencias antimicrobianas constituyen en la actualidad un grave problema en Salud Pública y en medicina veterinaria, siendo las responsables de muchos de los fracasos terapéuticos. Parece que la capacidad del ser humano de sintetizar nuevos compuestos con actividad antibacteriana se ha visto superada por la habilidad de los microorganismos para desarrollar mecanismos de resistencia.

La creciente aparición de microorganismos patógenos para el ser humano resistentes a la acción de los antimicrobianos se ha relacionado en múltiples ocasiones con el uso de antimicrobianos en ganadería. Este hecho ha provocado que en los últimos años se haya producido un endurecimiento en la legislación en cuanto a la administración de antibacterianos a los animales de abasto, tal y como lo demuestra la prohibición del uso de antimicrobianos a dosis sub-terapéuticas como agentes promotores del crecimiento en toda la Unión Europea desde el año 2006 (Reglamento de la CE 1831/2003). Según algunos estudios, el cese de la administración de antimicrobianos como promotores de crecimiento está directamente relacionado con una disminución de las resistencias bacterianas en los animales de abasto (Aarestrup *et al.*, 2001). Por tanto, parece razonable limitar el uso de antibióticos con fines meramente productivos. Sin embargo, el empleo de antimicrobianos en ganadería se hace indispensable para asegurar la salud y el bienestar de los animales y para evitar la transmisión de enfermedades zoonóticas al ser humano. En este contexto, se hace necesario llevar a cabo estudios en los que se evalúe el riesgo de aparición de microorganismos resistentes en los animales de abasto sometidos a un tratamiento antibiótico para intentar determinar las pautas terapéuticas que permitan reducir, en la medida de lo posible, la aparición de resistencias. En este sentido, aunque existen estudios *in vitro* que analizan la aparición y selección de cepas bacterianas resistentes en presencia de antimicrobianos (Sufya *et al.*, 2003), se considera de gran interés realizar ensayos *in vivo* que permitan evaluar el efecto de la administración de antimicrobianos sobre la emergencia y/o selección de bacterias resistentes, y muy especialmente cuando el tratamiento se realiza por vía oral, lo que es bastante frecuente en las especies de abasto, ya que implica el contacto directo del antimicrobiano con las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal, tales como, por ejemplo, *Escherichia coli*. Además, estas bacterias pueden actuar como reservorio de determinantes de resistencia que pueden ser intercambiados entre microorganismos de

animales o entre microorganismos de animales y de seres humanos, bien por contacto directo o indirecto a través de la cadena alimentaria (Collignon y Aarestrup, 2007; Bibbal *et al.*, 2009).

Al emplear un antibiótico tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, se administran dosis terapéuticas calculadas previamente en base a estudios farmacológicos. Sin embargo, cabe pensar y analizar si la dosis administrada de antibiótico pudiera tener alguna influencia en cuanto a la aparición o selección de cepas bacterianas resistentes, más aún cuando se ha relacionado la administración de dosis bajas de antimicrobianos durante un tiempo prolongado, pauta empleada al usar los antibióticos como promotores de crecimiento, con un incremento en la selección de cepas bacterianas resistentes (van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Emborg *et al.*, 2004).

Así pues, con estos antecedentes, se planteó este estudio que forma parte de un proyecto conjunto con el CReSA (Centre de Recerca en Sanitat Animal) en el que se pretendió analizar el riesgo de aparición y selección de cepas bacterianas resistentes en animales de abasto (cerdos, pollos y conejos) medicados con diferentes dosis de un determinado antibiótico (colistina en cerdos, enrofloxacin en pollos y doxiciclina en conejos), eligiendo como prototipo de bacterias gram-negativas a *E. coli* y como prototipo de gram-positivas a *Enterococcus spp.*, tal y como recomienda la EMEA para llevar a cabo estudios de seguimiento de resistencias en bacterias intestinales (EMEA/CVMP/244/01-FINAL).

En consecuencia, el **objetivo general** de este estudio fue evaluar el riesgo de desarrollo o selección de cepas de *E. coli* resistentes a diferentes antimicrobianos en cerdos tratados con colistina por vía oral y determinar si la dosis de colistina administrada influye en la aparición de dichas resistencias.

Para poder alcanzar dicho objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- Determinar el efecto de la administración por vía oral en cerdos de tres dosis diferentes de colistina (sub-terapéutica, terapéutica y superior a la terapéutica) sobre los índices de resistencia de *Escherichia coli* a colistina, amoxicilina, doxiciclina, gentamicina y enrofloxacin con el fin de analizar, a través del estudio de los porcentajes de aislados resistentes, sensibles y de sensibilidad intermedia, el riesgo de generación o selección de cepas resistentes que existe con la administración de las diferentes pautas terapéuticas.
- Estudiar la presencia de los principales genes de resistencia a los antibióticos incluidos en el estudio en las cepas de *E. coli* resistentes encontradas en este trabajo.
- Analizar los perfiles de resistencia antimicrobiana en los aislados de *E. coli* obtenidos en cada etapa del ensayo y en cada grupo de tratamiento y sus modificaciones.
- Analizar la relación clonal existente entre los aislados de *E. coli* obtenidos en cada una de las etapas y de cada uno de los grupos de tratamiento a través del estudio de los perfiles genotípicos obtenidos por REP-PCR y analizar la relación existente entre esos perfiles genotípicos y los fenotipos de resistencia con el fin de intentar determinar la persistencia de los aislados resistentes y la posible difusión de la resistencia por transferencia vertical u horizontal.
- Investigar la posible transferencia de genes entre dos bacterias intestinales como son *E. coli* y *Enterococcus spp.* mediante el estudio de la localización y la transferencia del gen de resistencia a tetraciclinas *tet(M)* detectado en los aislados de *E. coli* procedentes de los cerdos tratados con colistina.

3-MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DESARROLLO DEL ENSAYO EXPERIMENTAL REALIZADO CON CERDOS TRATADOS POR VÍA ORAL CON DIFERENTES DOSIS DE COLISTINA.

En este ensayo se emplearon 12 cerdos (6 machos y 6 hembras) Pietrain cruzados con Landrace con un peso inicial de $23 \pm 3,99$ Kg. Cada animal se alojó en una jaula individual durante todo el ensayo experimental. Estos animales se repartieron en tres grupos de tratamiento compuestos cada uno de ellos por dos machos y dos hembras. Cada grupo de tratamiento recibió una dosis diferente de colistina vía oral durante cinco días a través del agua de bebida. De esta forma, el primer grupo fue tratado con 10 mg/Kg p.v./día durante 5 días (dosis terapéutica), el segundo grupo recibió una dosis de 5 mg/Kg p.v./día de colistina durante 5 días (dosis subterapéutica) y el tercer grupo fue medicado con una dosis de 15 mg/Kg p.v./día durante 5 días (dosis superior a la terapéutica). Las soluciones del antibiótico que se administraron a los animales se prepararon diariamente a partir de polvo soluble de sulfato de colistina al 50%. Para asegurar la ingestión correcta de la dosis de colistina administrada en cada caso, se realizó un seguimiento del consumo individual de agua por cada animal durante los dos días previos al inicio del experimento para determinar el consumo diario promedio y posteriormente calcular la concentración de la solución de sulfato de colistina al 50% que se debía emplear.

3.2. TOMA DE MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO BACTERIANO.

Para llevar a cabo el muestreo de los contenidos ileales se procedió a la implantación quirúrgica de una sonda íleo-cutánea tipo T antes de iniciar el ensayo experimental. El contenido ileal se muestreó en tres momentos diferentes: antes de iniciar la administración de colistina, después de los cinco días de tratamiento con colistina y un mes después de haber finalizado la administración de colistina. Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su llegada al laboratorio, donde se congelaron a -70°C hasta el momento de ser procesadas.

3.3. PROCESADO DE LAS MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO BACTERIANO.

Las muestras del contenido ileal procedentes del ensayo con cerdos se homogeneizaron añadiendo 10 ml de agua de peptona tamponada (BPW; MerK) por cada gramo de muestra. A partir de 0,1 ml de estas suspensiones se sembraron placas de agar McConkey (Merck) para llevar a cabo el aislamiento de *Escherichia coli*. Las placas se incubaron rutinariamente a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se procuraron seleccionar un total de 10 colonias por muestra con características morfológicas compatibles con *E. coli*. Con cada colonia se realizaron hasta 4 pases en el medio *Trypticase soy agar* (Merck) empleándose el último pase para realizar la identificación a nivel de especie a través del sistema Vitek Junior® (BioMérieux). Los aislados en este pase fueron congelados a -70°C para constituir el cepario con el que posteriormente se seguiría trabajando.

Tanto la parte experimental del estudio como el aislamiento bacteriano para constituir el cepario con el que se desarrolló el resto de este trabajo se llevaron a cabo en el Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) por el grupo de investigación del Dr. Ignacio Badiola.

3.4. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Se estudió la sensibilidad *in vitro* de los aislados de *E. coli* obtenidos durante los ensayos experimentales frente a cinco antimicrobianos: doxiciclina (perteneciente al grupo de las tetraciclinas), amoxicilina (β -lactámico), gentamicina (aminoglucósido), enrofloxacin (fluoroquinolona) y colistina (antibiótico polipeptídico). Para ello se empleó el sistema de difusión en disco siguiendo las recomendaciones del *National Committee of Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, actualmente CLSI) publicadas en el documento NCCLS M31-A2 (2003). La cepa de *Escherichia coli* ATCC®25922 se empleó como control durante la realización de los antibiogramas.

Para llevar a cabo el análisis de sensibilidad antimicrobiana, los aislados se sembraron en el medio Luria-Bertani (BD) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. A partir de estos cultivos, se prepararon suspensiones bacterianas en cloruro sódico al 0,45 % (BioMérieux) con una

turbidez del 0,5 de la escala de Sulfato de Bario de McFarland. El grado de turbidez se ajustó empleando un fotocolorímetro (Biomeriéux) con filtro de 450 nm. Se estimó que estas suspensiones contenían en torno a 1×10^8 ufc/ml. Cada suspensión obtenida se sembró inmediatamente con un hisopo de algodón estéril en placas de Mueller-Hinton (Biomedics) y se procedió a dispensar los discos de antibióticos (Neo-Sensitabs®; Rosco Diagnostica) a través de un dispensador proporcionado por el fabricante. En cada placa se dispensaron un total de 5 discos (1 por cada antibiótico estudiado). Las concentraciones de antibiótico empleadas en cada caso fueron las siguientes: doxiciclina 80 µg/disco, amoxicilina 30 µg/disco, gentamicina 40 µg/disco, enrofloxacin 10 µg/disco y colistina 150 µg/disco.

Tras incubar las placas a 37°C durante 24 horas, se llevó a cabo la lectura de los halos de inhibición de cada antibiótico ensayado. Los diámetros de los halos de inhibición se interpretaron siguiendo las indicaciones publicadas en el documento de la NCCLS M31-A2 para catalogar a los aislados como sensibles, intermedios o resistentes a cada uno de los antibióticos estudiados. En el caso de la interpretación de los halos de colistina, seguimos los puntos de corte facilitados por el fabricante de los discos de antibióticos (Neo-Sensitabs®, Rosco Diagnostica) publicados en la guía del usuario del año 2005-2006, ya que en el documento M31-A2 no aparecen reflejados. De esta forma, se consideró a un aislado como sensible a colistina cuando el halo de inhibición era ≥ 20 mm, de sensibilidad intermedia cuando el halo se encontraba entre 17 y 19 mm y resistente cuando el halo era ≤ 16 mm.

3.5. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA.

Todos los genes de resistencia analizados se detectaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.5.1. Extracción de ADN.

El ADN empleado en las reacciones de PCR se extrajo siguiendo el método de ebullición. Para ello, se sembraron previamente los aislados de *E. coli* en el medio Luria-Bertani y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Una vez recuperadas los aislados, se tomaron varias colonias con el

asa de siembra y se preparó una suspensión bacteriana en 120 µl de agua bidestilada. Esta suspensión se sometió a ebullición a 100°C durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó la muestra a 9.300 x *g* durante 8 minutos y se recuperó un volumen de 90 µl de líquido sobrenadante a partir del cual se llevaron a cabo las reacciones de PCR.

3.5.2. Detección de genes de resistencia a tetraciclinas.

3.5.2.1. Muestreo de aislados y genes de resistencia a tetraciclinas analizados.

A lo largo del ensayo experimental se detectaron un total de 203 aislados resistentes a doxiciclina. De estos aislados, 81 se consideraron como altamente resistentes (halo de inhibición = 9 mm) y 122 como resistentes (halo de inhibición > 9 mm ≤ 14 mm). La presencia de los genes de resistencia a tetraciclinas se analizó en un total de 99 aislados, que incluyeron los 81 aislados altamente resistentes y 18 aislados resistentes. Estos 18 aislados resistentes que se incluyeron en el estudio se seleccionaron empleando un muestreo aleatorio simple proporcional a cada etapa del ensayo experimental (inicio, fin de tratamiento y post-tratamiento) incluyendo 5 aislados de la etapa inicial, 7 de la etapa fin de tratamiento y 6 de la fase post-tratamiento, procurando que en este muestreo estuvieran incluidos aislados procedentes de todos los animales. Los genes de resistencia a las tetraciclinas que se estudiaron fueron: *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(M)*.

3.5.2.2. Reacción de PCR y oligonucleótidos empleados.

Los oligonucleótidos empleados para la detección de cada uno de los genes se detallan en la tabla 1. La síntesis de todos ellos se llevó a cabo por la empresa Sigma-Aldrich. Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Ng *et al.* (2001), aunque con algunas modificaciones.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl. Para llegar a este volumen final se emplearon:

Tabla.1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de genes de resistencia y para la amplificación de la región QRDR de los genes *gyrA* y *parC*.

Referencia	Gen	Secuencias (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
Ng <i>et al.</i> (2001)	<i>tet(A)</i>	GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210
Ng <i>et al.</i> (2001)	<i>tet(B)</i>	TTGGTTAGGGGCAAGTTTGT GTAATGGGCCAATAACACCG	659
Ng <i>et al.</i> (2001)	<i>tet(M)</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTCGTCACACAC	406
Colom <i>et al.</i> (2003)	<i>bla_{TEM}</i>	ATCAGCAATAAACCCAGC CCCCGAAGAACGTTTTTC	516
Colom <i>et al.</i> (2003)	<i>bla_{SHV}</i>	AGGATTGACTGCCTTTTTTG ATTTGCTGATTTGCTCG	392
Colom <i>et al.</i> (2003)	<i>bla_{OXA-1}</i>	ATATCTCTACTGTTGCATCTCC AAACCCCTTCAAACCATCC	619
Diarrassouba <i>et al.</i> (2007)	<i>bla_{CMY-2}</i>	ATAACCACCCAGTCACGC CAGTAGCGAGACTGCGCA	631
Vanhoof <i>et al.</i> (1992)	<i>ant(2'')-Ia</i>	ATGTTACGCAGCAGGGCAGTCG CGTCAGATCAATATCATCGTGC	188
Sandvang <i>et al.</i> (2000)	<i>aac(3)-II</i>	TGAAACGCTGACGGAGCCTC GTCGAACAGGTAGCACTGAG	369
Sandvang <i>et al.</i> (2000)	<i>aac(3)-IV</i>	GTGTGCTGCTGGTCCACAGC AGTTGACCCAGGGCTGTCGC	627
Lee <i>et al.</i> (2005)	QRDR de <i>gyrA</i>	ACGTACTAGGCAATGACTGG AGAAGTCGCCGTCGATAGAAC	191
Lee <i>et al.</i> (2005)	QRDR de <i>parC</i>	TGTATGCGATGTCTGAACTG CTCAATAGCAGCTCGGAATA	264

- 2 µl de ADN extraído por el método de ebullición.
- 5 µl de tampón de PCR 10x (GeneAmp® 10x PCR Gold Buffer, Applied Biosystems Roche) conteniendo Tris-HCl y KCl.
- 6 µl de solución de Cloruro de Magnesio 25 mM (Applied Biosystems Roche).
- 0,6 µl de la mezcla de dNTPs (GeneAmp® dNTPs, Applied Biosystems Roche).
- 0,5 µl de cada oligonucleótido empleado para amplificar el gen *tet(A)* (concentración final de 1 µM).
- 0,125 µl de cada oligonucleótido empleado para amplificar el gen *tet(B)* (concentración final de 0,25 µM).
- 0,25 µl de cada oligonucleótido empleado para amplificar el gen *tet(M)* (concentración final de 0,5 µM).
- 0,5 µl de ADN polimerasa Amplitaq Gold® (Applied Biosystems Roche).
- Agua bidestilada hasta completar los 50 µl.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* (Eppendorf).

Los genes *tet(A)* y *tet(B)* se detectaron conjuntamente a través de una PCR múltiple que incluyó los 4 oligonucleótidos necesarios para detectar estos dos genes, mientras que el gen *tet(M)* se detectó a través de una PCR simple que incluyó únicamente los dos oligonucleótidos necesarios para amplificar este gen. Ambas reacciones se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Ng *et al.* (2001) aunque para amplificar el gen *tet(M)* se disminuyó la temperatura de anillamiento a 51°C en lugar de los 55°C descritos en el protocolo publicado por estos autores. De esta forma, las condiciones empleadas fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos.
- 35 ciclos de amplificaciones que constaron de una fase de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, una fase de hibridación de oligonucleótidos a 55°C durante 1 minuto para amplificar *tet(A)* y *tet(B)* y a 51°C durante 1 minuto para amplificar *tet(M)* y una fase de elongación a 72°C durante 1,5 minutos.
- Elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2,5% preparados con Tris –acetato EDTA (TAE) al 1x (BioRad) y teñidos con una solución al 1x de SYBR® Safe (Invitrogen). Como marcador de peso molecular se empleó *Step Ladder 50bp* (50-3000 pb)(Sigma-Aldrich).

Las cepas empleadas como controles positivos en las reacciones de PCR fueron las siguientes: *E. coli* Co228, portadora del gen *tet(A)*, *E. coli* Co71, portadora del gen *tet(B)* y *Enterococcus spp.* C-130, portador del gen *tet(M)*.

3.5.3. Detección de genes de resistencia a β -lactámicos.

3.5.3.1. Muestreo de aislados y genes de resistencia a β -lactámicos analizados.

Dado el alto número de aislados resistentes a β -lactámicos que se encontraron en el estudio, para el análisis de los genes de resistencia se realizó un muestreo aleatorio simple proporcional a cada etapa de tratamiento en el que se procuraron incluir aislados de todos los animales empleados en el ensayo experimental. De este modo, de los 251 aislados resistentes detectados en el ensayo se incluyeron en el análisis de los genes de resistencia un total de 120 (51 aislados de la etapa inicial, 47 de la etapa fin de tratamiento y 22 de la fase post-tratamiento). Todos estos aislados resistentes se consideraron como altamente resistentes (halo de inhibición = 9 mm).

Los genes de resistencia a β -lactámicos que se estudiaron fueron: *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} y *bla*_{SHV}.

3.5.3.2. Reacción de PCR y oligonucleótidos empleados.

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar cada uno de los genes analizados se detallan en la tabla 1. Todos ellos fueron sintetizados por la empresa Sigma-Aldrich.

La detección de los genes de resistencia *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} y *bla*_{SHV} se realizó a través de una PCR múltiple. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Colom *et al.* (2003). Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl, siendo su composición la siguiente:

- 2 µl de ADN extraído por ebullición.
- 2,5 µl de tampón de PCR 10x (GeneAmp® 10x PCR Gold Buffer, Applied Biosystems Roche) conteniendo Tris-HCl y KCl.
- 1,5 µl de solución de Cloruro de Magnesio 25 mM (Applied Biosystems Roche).
- 0,2 µl de la mezcla de dNTPs (GeneAmp® dNTPs, Applied Biosystems Roche).
- 0,5 µl de cada oligonucleótido empleado para amplificar el gen *bla*_{TEM} (concentración final de 1 µM).
- 0,75 µl de cada oligonucleótido empleado para amplificar el gen *bla*_{OXA-1} (concentración final de 1,5 µM).
- 0,25 µl de cada oligonucleótido empleado para amplificar el gen *bla*_{SHV} (concentración final de 0,5 µM).
- 0,2 µl de ADN polimerasa Amplitaq Gold® (Applied Biosystems Roche).
- Agua bidestilada hasta completar los 25 µl.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* (Eppendorf) siguiendo las condiciones descritas por Colom *et al.* (2003) que se describen a continuación:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos.
- 32 ciclos de amplificaciones que constaron de una fase de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una fase de hibridación de oligonucleótidos a 54°C durante 30 segundos y una fase de elongación a 72° durante 1 minuto.
- Elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa tal y como se describe en el apartado 3.5.2.2.

Las cepas empleadas como controles positivos fueron las siguientes: *E. coli* A3AGEC 425-427, portadora de los genes bla_{TEM} y bla_{SHV} y *Salmonella spp.* portadora del gen bla_{OXA-1}.

3.5.4. Detección de genes de resistencia a aminoglucósidos.

3.5.4.1. Muestreo de aislados y genes de resistencia a aminoglucósidos analizados.

Para seleccionar los aislados en los que analizar la presencia de genes de resistencia se realizó entre todos los aislados resistentes a aminoglucósidos un muestreo aleatorio simple proporcional a cada etapa de tratamiento en el que se incluyeron aislados de todos los animales. Así, a lo largo del ensayo se detectaron un total de 161 aislados resistentes a gentamicina, de los cuales 131 se consideraron como altamente resistentes (halo de inhibición = 9 mm). De estos 131 aislados altamente resistentes se analizó la presencia de los genes de resistencia a aminoglucósidos en un total de 64 aislados (20 procedentes de la etapa inicio de tratamiento y 44 de la etapa fin de tratamiento). En el caso de los aislados resistentes (halo de inhibición >9 mm ≤ 12 mm) se analizó la presencia de los genes de resistencia a gentamicina en un total de 20 aislados (4 aislados procedentes de la etapa inicial, 6 de la etapa fin de tratamiento y 10 de post-tratamiento).

Los genes de resistencia a aminoglucósidos estudiados fueron: *aac(3)-IIa*, *aac(3)-IVa* y *ant(2'')-Ia*.

3.5.4.2. Reacción de PCR y oligonucleótidos empleados.

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar los genes de resistencia a aminoglucósidos se detallan en la tabla 1. Todos ellos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich.

Se desarrolló una PCR múltiple para amplificar los tres genes analizados. Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que incluía los siguientes reactivos:

- 2 µl de ADN extraído por ebullición.
- 5 µl de tampón de PCR 10x (GeneAmp® 10x PCR Gold Buffer, Applied Biosystems Roche) conteniendo Tris-HCl y KCl .
- 3 µl de solución de Cloruro de Magnesio 25 mM (Applied Biosystems Roche).
- 0,4 µl de la mezcla de dNTPs (GeneAmp® dNTPs, Applied Biosystems Roche).
- 0,5 µl de cada oligonucleótido empleado para amplificar el gen *ant(2'')-I* (concentración final de 1 µM).
- 0,5 µl de cada oligonucleótido empleado para amplificar el gen *aac(3)-II* (concentración final de 1 µM).
- 0,5 µl de cada oligonucleótido empleado para amplificar el gen *aac(3)-IV* (concentración final de 1 µM).
- 0,2 µl de ADN polimerasa Amplitaq Gold® (Applied Biosystems Roche).
- Agua bidestilada hasta completar los 50 µl.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* (Eppendorf) siguiendo el protocolo descrito por Vanhoof *et al.* (1992). Las condiciones empleadas fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos.
- 30 ciclos de amplificaciones que constaron de una fase de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una fase de hibridación de oligonucleótidos a 55°C durante 45 segundos y una fase de elongación a 72° durante 2 minutos.
- Elongación final a 72°C durante 3 minutos.

Los controles positivos empleados en las reacciones de PCR fueron: *E. coli* K2 portadora del gen *ant(2'')-I*, *E. coli* K8 portadora del gen *aac(3)-II* y *E. coli* K13 portadora del gen *aac(3)-IV*.

3.5.5. Amplificación de la región QRDR de los genes *gyrA* y *parC*.

3.5.5.1. Aislados incluidos en el estudio.

A lo largo del ensayo se detectaron 21 aislados resistentes a enrofloxacin, de los cuales 15 se consideraron como altamente resistentes (halo de inhibición = 9) y 6 como resistentes (halo de inhibición $> 9 \text{ mm} \leq 16 \text{ mm}$). La región QRDR se analizó en todos ellos.

3.5.5.2. Reacción de PCR y oligonucleótidos empleados.

Para amplificar la región QRDR de los genes *gyrA* y *parC* se emplearon los oligonucleótidos descritos en la tabla 1.

Se realizó una PCR simple para amplificar la región QRDR del gen *gyrA* y otra para la región QRDR del gen *parC*. Las condiciones empleadas en ambas fueron las mismas y se extrajeron del protocolo publicado por Lee *et al.* (2005).

Para llevar a cabo cada reacción de PCR se trabajó con un volumen final de 50 μl , siendo su composición la siguiente:

- 2 μl de ADN extraído por ebullición.
- 5 μl de tampón de PCR 10x (GeneAmp® 10x PCR Gold Buffer, Applied Biosystems Roche) conteniendo Tris-HCl y KCl.
- 6 μl de solución de Cloruro de Magnesio 25 mM (Applied Biosystems Roche).
- 0,4 μl de la mezcla de dNTPs (GeneAmp® dNTPs, Applied Biosystems Roche).
- 0,1 μl de cada oligonucleótido necesario para amplificar la región QRDR del gen *gyrA* (concentración final de 0,2 μM).
- 0,1 μl de cada oligonucleótido necesario para amplificar la región QRDR del gen *parC* (concentración final de 0,2 μM).
- 0,5 μl de ADN polimerasa Amplitaq Gold® (Applied Biosystems Roche).
- Agua bidestilada hasta completar los 50 μl .

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* (Eppendorf) empleando las condiciones descritas por Lee *et al.* (2005), que fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos.
- 30 ciclos compuestos por una fase de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, una fase de hibridación de los oligonucleótidos a 55°C durante 1 minuto y una fase de elongación a 72°C durante 1 minuto.
- Elongación final a 72°C durante 5 minutos.

3.5.5.3. Purificación y secuenciación de los productos de amplificación de la región QRDR de los genes *gyrA* y *parC* obtenidos por PCR para determinar la presencia de mutaciones.

Para la purificación de los productos de PCR obtenidos se empleó el sistema comercial *SpinPrep™ PCR Clean-up kit* (Novagen, Merck). Los productos de PCR purificados fueron secuenciados (Secugen S.L.) empleando los mismos oligonucleótidos que en la reacción de PCR. Las secuencias genéticas obtenidas se analizaron con el programa informático Vector NTI® Advance 9.0 (Invitrogen) para detectar las posibles mutaciones presentes en los genes estudiados.

3.6. ESTUDIO DE LOS PERFILES GENOTÍPICOS Y ANÁLISIS DE LA RELACIÓN CLONAL EXISTENTE ENTRE LOS AISLADOS DE *E. coli*.

Para llevar a cabo la tipificación de los aislados de *E. coli* obtenidos a lo largo del ensayo experimental se empleó la técnica de REP-PCR o PCR de secuencias palindrómicas repetitivas.

3.6.2. Extracción de ADN.

La extracción de ADN para realizar la REP-PCR se realizó por el método de ebullición, tal y como se describe en el apartado 3.5.1.

3.6.3. Reacción de REP-PCR y oligonucleótidos empleados.

Los oligonucleótidos utilizados en la REP-PCR fueron REP1R-I y REP2-I (tabla 2.).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la tipificación de las cepas de *E. coli* por REP-PCR.

Referencia	Nombre	Secuencia (5'-3')
Versalovic <i>et al.</i> (1991)	REP2-I	ICGICTTATCIGGCCTAC
Versalovic <i>et al.</i> (1991)	REP1R-I	IIICGICGICATCIGGC

* La "I" representa a la Inosina.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, siendo su composición la siguiente:

- 2,5 µl de ADN previamente extraído por el método de ebullición.
- 15 µl de Amplitaq Gold[®] PCR Master Mix (Applied Biosystems Roche), conteniendo: Tris-HCL, KCl, mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), MgCl₂ y ADN polimerasa Amplitaq Gold[®].
- 1 µl de solución de Cloruro de Magnesio 25mM (Applied Biosystems Roche).
- 2,5 µl de una dilución 1/100 de Tween-20 (Sigma-Aldrich).
- 1 µl de cada oligonucleótido (concentración final de 4 µM).
- 2 µl de agua bidestilada.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* (Eppendorf) siguiendo las condiciones que se enumeran a continuación:

- Desnaturalización inicial durante 4 minutos a 94°C.
- 35 ciclos de amplificaciones que constaron de: una fase de desnaturalización a 94°C durante 1,15 minutos, una fase de hibridación de oligonucleótidos a 42°C durante 1 minuto y una fase de elongación a 72°C durante 6 minutos.
- Elongación final a 72°C durante 15 minutos.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa a una concentración de 2,5% elaborados con Tris –acetato EDTA (TAE) al 1x (BioRad) y teñidos con una solución de bromuro de etidio a concentración final de 0,5 µg/ml. Como marcador de peso molecular se empleó *Step Ladder 50bp* (50-3000 pb)(Sigma-Aldrich).

3.6.5. Análisis de los perfiles genotípicos obtenidos por REP-PCR.

Todas las imágenes de los geles de agarosa donde se visualizaron las bandas obtenidas por REP-PCR se analizaron con el programa informático GelCompar® II (Applied Maths). La posición de las bandas en cada uno de los geles se normalizó en base al marcador de peso molecular *Step Ladder 50bp* (Sigma-Aldrich). La relación genotípica entre los aislados se basó en la similitud existente entre los patrones de bandas. Esta similitud se determinó gracias al programa GelCompar® II utilizando el coeficiente de correlación de Dice y UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y estableciendo un índice de tolerancia y de optimización del 1% para comparar los patrones de bandas de los aislados y crear los dendogramas necesarios para el análisis visual de los resultados. Estos dendogramas se analizaron considerando que formaban parte de un mismo clon los aislados cuyo grado de similitud fuera igual o superior al 95%, siguiendo los criterios publicados por otros autores (Cleland *et al.*, 2008; Vigil *et al.*, 2009).

3.7. ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL GEN *tet(M)* DETECTADO EN LOS AISLADOS DE *E. coli* PROCEDENTES DE CERDOS TRATADOS CON COLISTINA.

3.7.1. Aislados bacterianos incluidos en el estudio.

Durante el análisis de los genes de resistencia a tetraciclinas, que se llevó a cabo con los aislados resistentes detectados a lo largo del ensayo realizado con cerdos tratados con colistina, se identificó el gen *tet(M)* en un total de 13 aislados de *E. coli* de sensibilidad intermedia a colistina y resistentes a doxiciclina obtenidos en la etapa FT y procedentes de 4 animales: animal 2, del grupo de tratamiento de 5 mg/kg/día, animal 7, del grupo de tratamiento de 15 mg/kg/día, animal 9, del grupo de 10 mg/kg/día y animal 10, del grupo de tratamiento de 10 mg/kg/día . Además de estos 13 aislados, en este estudio se incluyeron 36 aislados de *Enterococcus spp.* *tet(M)* positivos procedentes de esos mismos animales, incluyéndose 3 aislados por cada animal y momento de la toma de muestras. Los aislados de enterococos fueron cedidos por el grupo del Dr. Ignacio Badiola (CReSA), que se encargó de llevar a cabo un estudio similar al desarrollado por nuestro grupo de investigación pero trabajando con aislados de enterococos.

3.7.2. Detección de los transposones Tn916, Tn5397 y Tn5801.

El gen *tet(M)* suele estar localizado en elementos genéticos móviles (transposones y plásmidos conjugativos). Por este motivo, se analizó por PCR la presencia de los transposones Tn916, Tn5397 y Tn5801 en los 13 aislados de *E. coli* portadores del gen *tet(M)* y en los 36 enterococos seleccionados. Para la detección del transposón Tn916 se amplificó por PCR el gen *xis-Tn* (codificante de una proteína relacionada con la escisión del transposón Tn916). Para identificar el transposón Tn5397 se amplificó el gen *tndX* (codificante de una enzima resolvasa) y para detectar el transposón Tn5801 se amplificó el gen *int* (codificante de una integrasa).

3.7.2.1. Extracción de ADN.

La extracción de ADN para llevar a cabo las reacciones de PCR se hizo tal y como se explica en el apartado 3.5.1.

3.7.2.2. Reacción de PCR y oligonucleótidos empleados.

Los oligonucleótidos empleados para amplificar los genes *xis-Tn* (Tn916-1 y Tn916-2), *tndX* (Tn5397-tndX-1 y Tn5397-tndX-2) e *int* (intcw459-1 y intcw459-2) figuran en la tabla 3. En los tres casos se llevaron a cabo reacciones de PCR en un volumen final de 50 µl que contenía los siguientes reactivos:

- 2 µl de ADN previamente extraído por ebullición.
- 5 µl de tampón de PCR 10X (Ampliqon 10x Standard Buffer, Herlev, Denmark) conteniendo: Tris-HCl, KCl y ClMg_2 .
- 0,5 µl de la mezcla de dNTPs (dNTP Mix, Ampliqon, Herlev, Denmark).
- 0,5 µl de cada oligonucleótido empleado en cada caso (Tn916-1 a concentración final de 2,6 µM; Tn916-2 a concentración final de 1,6 µM; Tn5397-tndX-1 a concentración final de 1 µM; Tn5397-tndX-2 a concentración final de 1,5 µM; intcw459-1 a concentración final de 2,2 µM y intcw459-2 a concentración final de 2,1 µM).
- 0,5 µl de ADN polimerasa.
- Agua bidestilada hasta completar los 50 µl.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *TRIO Thermocycler* (Biometra, Göttingen, Alemania).

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la detección de los genes *xis-Tn*, *tndX* e *int*.

Referencia	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)
Agersø <i>et al.</i> (2006)	Tn916-1	GCCATGACCTATCTTATA	476
	Tn916-2	CTAGATTGCGTCCAA	
Agersø <i>et al.</i> (2006)	Tn5397-tndX-1	ATGATGGGTTGGACAAAGA	610
	Tn5397-tndX-2	CTTTGCTCGATAGGCTCTA	
De Vries <i>et al.</i> (2009)	intcw459-1	CCGATATTGAGCCTATTGATGTG	722
	intcw459-2	GTCCATACGTTCTAAAGTCGTC	

Para amplificar el gen *xis-Tn* se emplearon las condiciones descritas por Agersø *et al.* (2006), que fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos.
- 35 ciclos compuestos por: una fase de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, una fase de hibridación de los oligonucleótidos a 45°C durante 1 minuto y una fase de elongación a 72°C durante 1 minuto.
- Elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Para amplificar el gen *tndX* también se utilizaron las condiciones publicadas por Agersø *et al.* (2006), que en este caso fueron las descritas a continuación:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos.
- 35 ciclos compuestos por: una fase de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, una fase de hibridación de los oligonucleótidos a 53°C durante 1 minuto y una fase de elongación a 72°C durante 1 minuto.
- Elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Para amplificar el gen *int* del Tn5801 se emplearon las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos.
- 30 ciclos compuestos por: una fase de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, una fase de hibridación de los oligonucleótidos a 48°C durante 1 minuto y una fase de elongación a 72°C durante 1 minuto.
- Elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% preparados con Tris-Borato-EDTA (TBE) y teñidos con una solución de bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. Como marcador de peso molecular se empleó *100 bp DNA ladder* (New England Biolabs®, USA).

Como controles positivos en estas reacciones de PCR se emplearon *Enterococcus faecalis* CG110 (Clewell, 1990) portador del Tn916, *Bacillus subtilis* CU2189 (Roberts *et al.*, 2001) portador del Tn5397 y *Staphylococcus aureus* Mu50 (Kuroda *et al.*, 2001) portador del Tn5801.

3.7.3. Estudio de la posible transferencia por conjugación del gen *tet(M)* a través de la técnica de *filter mating*.

Con el objetivo de determinar la posible transferencia del gen *tet(M)* detectado en los aislados de *E. coli* y en los enterococos, se desarrollaron tres ensayos de conjugación empleando como medio de contacto entre las bacterias donadoras y receptoras un filtro de celulosa, técnica conocida como *filter mating*.

3.7.3.1 Ensayo de conjugación entre aislados de enterococos.

3.7.3.1.1 Aislados bacterianos empleados.

En este ensayo de conjugación entre enterococos se emplearon como bacterias donadoras los siguientes aislados:

- *Enterococcus faecalis* CICYT-381 (procedente del animal 2 en la fase FT)
- *Enterococcus faecalis* CICYT-436 (procedente del animal 7 en la fase FT)
- *Enterococcus faecalis* CICYT-453 (procedente del animal 9 en la fase FT)
- *Enterococcus hirae* CICYT-467 (procedente del animal 10 en la fase FT)

Estos aislados eran portadores del gen *tet*(M) y en ninguno de ellos se detectó ni el transposón Tn916 ni el transposón Tn5397.

Como cepas receptoras se emplearon las siguientes:

- *Enterococcus faecalis* JH2-2
- *Enterococcus faecium* BM 4105

Ambas cepas receptoras eran sensibles a tetraciclinas y negativas al gen *tet*(M) y resistentes a rifampicina y al ácido fusídico .

De esta forma, se llevaron a cabo un total de 8 experimentos de conjugación, ya que con cada cepa donadora se realizó un experimento de conjugación con cada una de las cepas receptoras.

3.7.3.1.2. Protocolo utilizado para llevar a cabo la conjugación bacteriana.

El experimento de conjugación se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hammerum *et al.* (1998). De esta forma, tanto las cepas receptoras como las donadoras se sembraron en 10 ml de caldo infusión cerebro y corazón (BHI, BD) dispuestos en tubos de 50 ml. En el caso de las cepas donadoras, a este medio se le añadió una solución de tetraciclina para alcanzar una concentración de 4 µg/ml. Los tubos se incubaron en agitación a 37°C durante toda la noche. Tras este periodo de incubación, se añadió 1 ml de este cultivo a 10 ml de caldo BHI

precalentado a 37°C. En el caso de las cepas donadoras, se añadió de nuevo una solución de tetraciclina al medio hasta llegar a una concentración final de 4 µg/ml. Estos tubos se incubaron en agitación y a 37°C hasta que las suspensiones bacterianas alcanzaron una densidad óptica de aproximadamente 0,5 a 600nm. A continuación, y con el fin de eliminar cualquier resto de antibiótico, se centrifugaron los tubos a 15.000 x *g* durante 4 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de NaCl 0,9% a cada tubo, volviendo a centrifugar a la misma velocidad durante 4 minutos y eliminando de nuevo el sobrenadante. El material sedimentado se resuspendió en 2 ml de caldo BHI y las cepas donadoras y receptoras se mezclaron en tubos limpios añadiendo 300 µl de cada suspensión (proporción 1:1). Un total de 500 µl de esta mezcla de bacterias donadoras y receptoras se depositaron sobre filtros estériles con un tamaño de poro de 0,45 µm y 47 mm de diámetro (S-Pak Filters™, Millipore) dispuestos en placas de agar sangre. Estas placas se incubaron rutinariamente a 37°C durante 24 horas.

Tras la incubación, los filtros se recuperaron con pinzas estériles y se introdujeron en tubos con 10 ml de ClNa 0,9%. Tras agitar los tubos para desprender de los filtros el crecimiento bacteriano, se sembraron 100 µl de esta suspensión en placas de agar sangre para verificar la ausencia de contaminación. Así mismo, se sembraron otros 100 µl (dilución -1) en el medio de selección de transconjugantes, que en este caso consistió en agar BHI (BD) con una concentración de 8 µg/ml de tetraciclina (Sigma-Aldrich), 12,5 µg/ml de rifampicina (Sigma-Aldrich) y 12,5 µg/ml de ácido fusídico (Sigma-Aldrich).

También se sembraron en el medio de selección de transconjugantes dos diluciones "0", cada una de las cuales se preparó tomando 1 ml de la suspensión anterior, centrifugando a 15.000 x *g* durante 4 minutos, eliminando 900 µl de sobrenadante y sembrando los 100 µl restantes tras haber resuspendido el sedimento.

Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y después se procedió al recuento de los transconjugantes. Las placas en las que no se observó crecimiento bacteriano a las 24 horas se revisaron de nuevo a las 48 horas de incubación. Los transconjugantes obtenidos se resembraron en un medio selectivo (*BBL™ Enterococcosel™ Agar*, BD) para comprobar que se trataba de enterococos.

3.7.3.1.3. Cálculo del límite de detección.

Para calcular el límite de detección se prepararon 9 diluciones (desde la -1 hasta la -9) a partir de la suspensión de CINA con las células bacterianas desprendidas del filtro. De estas diluciones, sólo se sembraron las cuatro más altas (desde la dilución -6 a la -9). Cada dilución se sembró en dos tipos de medios de cultivo: uno en el que tan sólo era posible el crecimiento de las cepas donadoras y otro en el que sólo podían crecer las cepas receptoras. El medio para las cepas donadoras estaba compuesto por agar BHI (BD) con 8 µg/ml de tetraciclina (Sigma-Aldrich). La composición del medio destinado al crecimiento de las receptoras era BHI con 12,5 µg/ml de rifampicina (Sigma-Aldrich) y 12,5 µg/ml de ácido fusídico (Sigma-Aldrich). En cada tipo de medio se sembraron 100 µl de cada una de las diluciones (desde -6 hasta -9). Las placas se incubaron rutinariamente y tras 24 horas de incubación se realizó un recuento de las colonias bacterianas en aquellas placas en las que hubiera entre 20 y 100 colonias. Con estos recuentos se calculó el límite de detección para cada uno de los ensayos de conjugación.

3.7.3.1.4. Identificación por PCR del gen *tet(M)* en los transconjugantes obtenidos.

Los transconjugantes obtenidos se resembraron de nuevo en el medio de selección de transconjugantes (agar BHI con 8 µg/ml de tetraciclina, 12,5 µg/ml de rifampicina y 12,5 µg/ml de ácido fusídico) para verificar que existía crecimiento. A continuación, se procedió a la identificación del gen *tet(M)* por técnicas de PCR, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.5.2. y empleando los oligonucleótidos descritos en la tabla 1.

3.7.3.2. Ensayo de conjugación empleando aislados de *E. coli* como donadores y aislados de enterococos como receptores.

3.7.3.2.1. Aislados bacterianos empleados.

Los aislados de *E. coli* empleados como donadores en este ensayo fueron las siguientes:

- *E. coli* CICYT-268 (procedente del animal 2 en la fase FT)
- *E. coli* CICYT-320 (procedente del animal 7 en la fase FT)
- *E. coli* CICYT-332 (procedente del animal 9 en la fase FT)
- *E. coli* CICYT-348 (procedente del animal 10 en la fase FT)

Estos aislados eran portadores del gen *tet*(M) y en ninguno de ellos se detectaron los transposones Tn916 o Tn5397.

Como aislados de enterococos receptores se emplearon los ya mencionados en el apartado 3.7.3.1.1.

Se analizó la posible transferencia por conjugación del gen *tet*(M) entre cada uno de los aislados donadores y cada uno de los receptores, realizándose un total de 8 ensayos.

3.7.3.2.2. Protocolo utilizado para llevar a cabo la conjugación bacteriana.

El protocolo seguido para realizar estos ensayos de conjugación fue el descrito en el apartado 3.7.3.1.2. Si bien, en este caso, el medio utilizado para la selección de transconjugantes fue agar BHI (BD) con 8 µg/ml de tetraciclina (Sigma-Aldrich), 12,5 µg/ml de rifampicina (Sigma-Aldrich) y 32 µg/ml de polimixina B (Sigma-Aldrich).

3.7.3.2.3. Cálculo del límite de detección.

El límite de detección se calculó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.7.3.1.3., aunque, en este caso, el medio selectivo empleado para el crecimiento de las cepas de *E. coli* donadoras fue agar BHI (BD) con 8 µg/ml de tetraciclina (Sigma-Aldrich) y el medio selectivo para el crecimiento de los enterococos receptores fue agar BHI (BD) con 12,5 µg/ml de rifampicina (Sigma-Aldrich) y 32 µg/ml de polimixina B (Sigma-Aldrich).

3.7.3.3 Ensayo de conjugación empleando aislados de enterococos como donadores y aislados de *E. coli* como receptores.

3.7.3.3.1. Aislados bacterianos empleados.

Como aislados donadores se emplearon los mismos 4 aislados de *Enterococcus spp.* mencionados en el apartado 3.7.3.1.1. Como aislado receptor se empleó *E. coli* CICY-70RI, resistente a rifampicina, sensible a tetraciclinas y no portador del gen *tet(M)*.

3.7.3.3.2. Protocolo utilizado para llevar a cabo la conjugación bacteriana.

Para realizar estos ensayos de conjugación se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.7.3.1.2., pero empleando un medio de selección de transconjugantes diferente, que en este caso fue agar BHI (BD) con 4 µg/ml de tetraciclina (Sigma-Aldrich) y 50 µg/ml de rifampicina (Sigma-Aldrich). La especie bacteriana de los transconjugantes se verificó resemebrándolos en agar McConkey (BD).

3.7.3.3.3. Cálculo del límite de detección.

El cálculo del límite de detección se realizó como en los casos anteriores, aunque en esta ocasión los medios empleados para el recuento de las cepas donadoras y receptoras fueron agar BHI (BD) con 4 µg/ml de tetraciclina (Sigma-Aldrich) y agar BHI con 50 µg/ml de rifampicina (Sigma-Aldrich) respectivamente.

3.7.3.3.4. Identificación por PCR del gen *tet(M)* en los transconjugantes obtenidos.

Los transconjugantes obtenidos se resemebraron en agar BHI con 4 µg/ml de tetraciclina y 50 µg/ml de rifampicina para verificar que existía crecimiento. La presencia del gen *tet(M)* en los

transconjugantes se analizó siguiendo el protocolo de PCR descrito en el apartado 3.5.2. y empleando los oligonucleótidos descritos en la tabla 1.

3.8 SECUENCIACIÓN Y RELACIÓN FILOGENÉTICA DEL GEN *tet(M)* DETECTADO EN LOS AISLADOS DE *E. coli* y *Enterococcus spp.* PROCEDENTES DE LOS CERDOS TRATADOS CON COLISTINA.

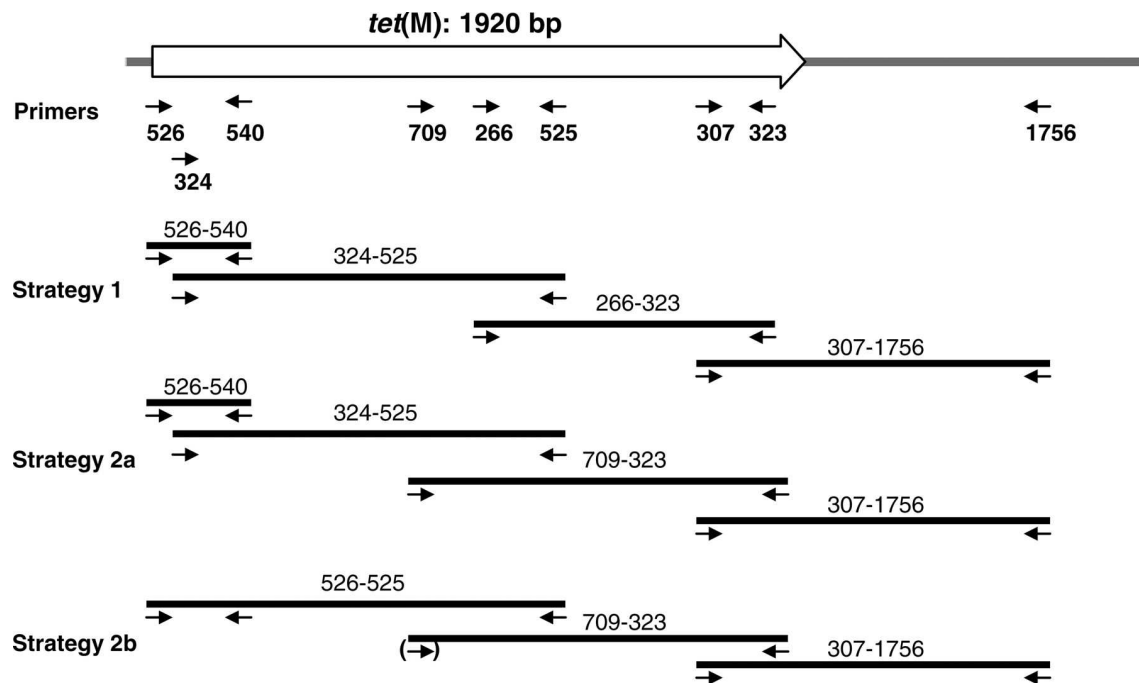
3.8.1 Amplificación de la secuencia completa del gen *tet(M)* por PCR.

La amplificación del gen *tet(M)* se realizó en los mismos aislados que se citan en el apartado 3.7.1. y para ello se siguió la estrategia sugerida por Agersø *et al.* (2006) (estrategia 2b, Figura 1) en la que para amplificar el extremo superior del gen se emplearon los oligonucleótidos 323, 525, 526, 540 y 709 (tabla 4) y para amplificar la parte inferior se emplearon los oligonucleótidos 307 y 1756 (tabla 4).

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la secuenciación del gen *tet(M)*.

Referencia	Nombre	Secuencia (5'-3')
Agersø <i>et al.</i> (2006)	323 (tetM-up)	CTGGCAAACAGGTTC
Agersø <i>et al.</i> (2006)	525 (tet M sekvens-1)	TACTTCCCTAAGAAAGAAAGT
Agersø <i>et al.</i> (2006)	526 (tet M upstream)	TTGAATGGAGGAAAATCAC
Agersø <i>et al.</i> (2006)	540 (Tet M seq-3)	GCAGAAATCAGTAGAATTGC
De Vries <i>et al.</i> (2009)	709 (TetM sekvens 6)	TCGAGGTCCGTCTGAAC
Agersø <i>et al.</i> (2006)	307 (Revers TetM-2)	TTGTTAGAGCCATATCTTAG
De Vries <i>et al.</i> (2009)	1756 (TetM sekvens 9)	AACAGTAAATGTATAGAGGTG

Figura 1. Estrategias de secuenciación del gen *tet(M).**



*Imagen cedida por la Dra. Y. Agersø.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador *TRIO Thermocycler* (Biometra, Göttingen, Alemania) empleando un volumen final de 50 µl que contenía los siguientes reactivos:

- 2 µl de ADN previamente extraído por ebullición.
- 5 µl de tampón de PCR 10X (Ampliqon 10x Standard Buffer, Herlev, Denmark) conteniendo: Tris-HCl, KCl y CaMg_2 .
- 1 µl de CaMg_2 25 mM.
- 1 µl de la mezcla de dNTPs (dNTP Mix, Ampliqon, Herlev, Denmark).
- 0,5 µl de cada oligonucleótido empleado en cada caso.
- 0,5 µl de ADN polimerasa.
- Agua bidestilada hasta completar los 50 µl.

Las condiciones de PCR empleadas para la secuenciación del gen *tet(M)* fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos.
- 35 ciclos compuestos por: una fase de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, una fase de hibridación de los oligonucleótidos a 46°C durante 1 minuto y una fase de elongación a 72°C durante 2 minutos.
- Elongación final a 72°C durante 10 minutos.

La secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR fue realizada por MacroGen (Korea) usando los mismos oligonucleótidos que se emplearon en las reacciones de PCR.

3.8.2 Análisis filogenético del gen *tet(M)*.

Se recurrió a GeneBank para buscar la secuencia completa del gen *tet(M)* basándonos en el hecho de que todos los genes *tet(M)* comparten al menos un 80% de similitud a nivel de la secuencia de aminoácidos (Chopra y Roberts, 2001). Aunque se secuenció el gen *tet(M)* en todos los aislados citados en el apartado 3.7.1, finalmente para el estudio filogenético se seleccionaron 11 secuencias del gen (4 de *E. coli* y 7 de enterococos). El grupo de investigación de la Dra. Agersø realizó un árbol filogenético “neighbour-joining (NJ) tree” basado en el alineamiento de las 11 secuencias del gen *tet(M)* obtenidas en este estudio (1802 pb de las 1920 pb del gen *tet(M)* completo) y 58 secuencias completas de este gen extraídas de GeneBank, empleando para ello Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) y visualizándolo a través del software Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). El árbol filogenético creado se enraizó con el gen *tet(O)* (GeneBank/EMBL/DDBJ número de acceso Y07780) como elemento externo no relacionado filogenéticamente.

3.9 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versión 17 para Windows.

Las diferencias estadísticas entre las frecuencias de resistencias antimicrobianas fueron determinadas por el Test exacto de Fischer. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los análisis se hicieron utilizando el software estadístico InStat (versión 3), GraphPad Inc., San Diego, CA.

4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AISLADOS DE *E. coli* OBTENIDOS DURANTE EL ENSAYO EXPERIMENTAL REALIZADO CON CERDOS TRATADOS POR VÍA ORAL CON DIFERENTES DOSIS DE COLISTINA.

Se administraron diferentes dosis de colistina a través del agua de bebida durante 5 días a un total de 12 cerdos Pietrain cruzados con Landrace con un peso de $23 \pm 3,99$ Kg. Los animales se dividieron en tres grupos de tratamiento. Uno de estos grupos recibió una dosis de 5 mg/kg/día (dosis sub-terapéutica), otro fue tratado con 10 mg/kg/día (dosis terapéutica) y el tercero recibió 15 mg/kg/día de colistina (dosis superior a la terapéutica). A través de una sonda íleo-cutánea, se recogieron muestras del contenido intestinal para proceder al aislamiento de bacterias intestinales en tres momentos diferentes del ensayo: antes de iniciar la administración del antibiótico, después de haber finalizado su administración y cuatro semanas después de haber completado el tratamiento. Como se indicó en el apartado de Material y Métodos, el propósito inicial era seleccionar 10 aislados de *E. coli* por animal y fase de tratamiento. No obstante, en determinados casos esto no fue posible porque no se obtuvo crecimiento de alguna de las muestras. Así, en la etapa inicial se aislaron los 120 aislados de *E.coli* que pretendíamos conseguir, pero en la etapa fin de tratamiento se obtuvieron únicamente 110 aislados (no se obtuvo crecimiento de la muestra de uno de los animales tratados con de 5 mg/kg/día) y en la etapa post-tratamiento se consiguieron sólo 70 aislados (no se obtuvo crecimiento de las muestras de 5 animales, uno del grupo de tratamiento de 5 mg/kg/día, otro del grupo de 15 mg/kg/día y los tres restantes del grupo de 10 mg/kg/día).

4.2 RESULTADOS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIO DE GENES DE RESISTENCIA.

4.2.1 RESULTADOS DE SENSIBILIDAD A COLISTINA.

4.2.1A Resultados de sensibilidad a colistina del total de los aislados de *E. coli*.

Tal y como se muestra en la tabla 5, el número de aislados resistentes a colistina fue muy bajo.

Sólo se detectó un aislado resistente en la etapa inicial (0,8%) y otro en la etapa fin de tratamiento (0,9%), mientras que en la etapa post-tratamiento no se detectó ningún aislado resistente a este antibiótico. Estos resultados concuerdan con los aportados por otros estudios realizados con aislados porcinos de *E. coli*. Así, por ejemplo, Kijima-Tanaka *et al.* (2003) observaron que únicamente un 0,8 % de los aislados procedentes de cerdos sanos eran resistentes a colistina y Mateu y Martín (2000) encontraron que el 83 % de los aislados de *E. coli* procedentes de cerdos con diarrea o edema eran sensibles a este antibiótico. Incluso hay autores que estudiando aislados de *E. coli* procedentes de cerdos con diarrea y edema no detectaron ningún aislado resistente a otro antibiótico del mismo grupo que la colistina como es la polimixina B (Lanz *et al.*, 2003).

Los antibióticos polipeptídicos como la colistina tienen un efecto bactericida rápido sobre los microorganismos coliformes gram-negativos como *E. coli*, resultando difícil la aparición de resistencias a este grupo de antibióticos en estos microorganismos (Storm *et al.*, 1977; Mateu y Martín, 2000; Trent *et al.*, 2001; Torrallardona *et al.*, 2003), lo que explicaría los elevados niveles de sensibilidad frente a colistina detectados en el presente estudio.

No obstante, y a pesar del bajo índice de resistencia detectado, al analizar la evolución del porcentaje de aislados de sensibilidad intermedia a colistina se observa un incremento muy notable de este porcentaje en la etapa fin de tratamiento, ya que inicialmente tan sólo el 0,8% de los aislados tuvieron una sensibilidad intermedia frente al antibiótico, mientras que al finalizar la administración de colistina, el recuento de aislados con sensibilidad intermedia se incrementó hasta alcanzar un valor del 26,4% (tabla 5) y, sin embargo, cuatro semanas después de finalizar la administración de colistina no se detectó ningún aislado de *E. coli* que presentase este nivel de sensibilidad (tabla 5). Por tanto, la influencia del tratamiento en la aparición de aislados de sensibilidad intermedia a colistina parece clara.

Tabla 5. Sensibilidad a los diferentes antimicrobianos del total de los aislados de *E. coli* procedentes de los cerdos tratados con colistina en las tres etapas del ensayo.

Antibiótico	Sensibilidad antimicrobiana*	Etapas del ensayo			
		AT*	FT	PT	Total
		% (n=120)	% (n=110)	% (n=70)	% (n=300)
	R**	0,8	0,9	0	0,7
Colistina	I	0,8	26,4	0	10,0
	S	98,3	72,7	100	89,3
	R	89,2	90,0	64,3	83,7
Amoxicilina	I	0	0	0	0
	S	10,8	10,0	35,7	16,3
	R	92,5	90,9	84,3	90,0
Doxiciclina	I	3,3	0	1,4	1,7
	S	4,2	9,1	14,3	8,3
	R	37,5	90,0	24,3	53,7
Gentamicina	I	4,2	0	1,4	2,0
	S	58,3	10,0	74,3	44,3
	R	15,0	0	4,3	7,0
Enrofloxacin	I	6,7	30,0	12,9	16,7
	S	78,3	70,0	82,9	76,3
	R	15,0	0	4,3	7,0

*AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

** R: resistente; I: sensibilidad intermedia; S: sensible.

4.2.1B Resultados de sensibilidad a colistina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.

Como puede observarse en la tabla 6, antes de administrar el tratamiento con colistina, sólo uno (2,5%) de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales incluidos en este grupo de tratamiento fue resistente a este antimicrobiano y no se detectó ningún aislado resistente ni en la etapa fin de tratamiento ni en la etapa post-tratamiento, concordando estos bajos índices de resistencia con los publicados en otros estudios (Mateu y Martin, 2000; Kijima-Tanaka *et al.*, 2003; Stannarius *et al.*, 2009). Sin embargo, cabe destacar el comportamiento de los aislados de sensibilidad intermedia a colistina, que no se detectaron ni antes del tratamiento con colistina ni cuatro semanas después de que el tratamiento hubiera finalizado, pero representaron el 43,3 % del total de los aislados de *E. coli* de la etapa fin de tratamiento (tabla 6).

4.2.1C Resultados de sensibilidad a colistina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día.

Dentro de este grupo de tratamiento, no se detectó ningún aislado de *E.coli* resistente a colistina en ninguna de las tres etapas del ensayo experimental (tabla 6).

En cuanto al comportamiento que siguieron los aislados de sensibilidad intermedia, en la tabla 6 puede observarse cómo también en los animales tratados con esta dosis se produjo un incremento en el recuento de estos aislados en la etapa fin de tratamiento, no detectándose ningún aislado de sensibilidad intermedia a colistina un mes después de haber finalizado la administración del antibiótico.

Tabla 6. Sensibilidad a colistina de los aislados de *E. coli* procedentes de las tres etapas del ensayo según la dosis administrada.

Etapas del ensayo	Dosis de colistina								
	5 mg/Kg/día			10 mg/Kg/día			15 mg/Kg/día		
	R**	I	S	R	I	S	R	I	S
AT* %									
(n [#] =120; n ₁ =40, n ₂ =40, n ₃ = 40)	2,5	0	97,5	0	2,5	97,5	0	0	100
FT %									
(n=110; n ₁ =30, n ₂ =40, n ₃ = 40)	0	43,3	56,7	0	20,0	80,0	2,5	20,0	77,5
PT %									
(n=70; n ₁ =30, n ₂ =10, n ₃ = 30)	0	0	100	0	0	100	0	0	100

*AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

**R: resistente; I: sensibilidad intermedia; S: sensible.

[#] n: número total de aislados por etapa; n₁, n₂ y n₃ se refieren al número de aislados por grupo de tratamiento.

4.2.1D Resultados de sensibilidad a colistina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día.

En este grupo de tratamiento, antes de iniciar la administración de colistina, no se detectó ningún aislado de *E.coli* resistente a este antibiótico (tabla 6). En la etapa fin de tratamiento, sólo una cepa (2,5%) fue resistente a colistina y de nuevo en la fase post-tratamiento no se obtuvo aislado alguno resistente a este antimicrobiano. En cuanto a los aislados de sensibilidad intermedia, debemos decir que sólo se detectaron en la fase fin de tratamiento, representando el 20% del total de los aislados de *E. coli* obtenidos en esta etapa.

El efecto bactericida que ejercen las polimixinas sobre microorganismos como *E. coli* parece depender principalmente de la dosis de antibiótico administrada (Storm *et al.*, 1977) y, consecuentemente, parece lógico pensar que a mayor dosis de tratamiento usada menor sea la probabilidad de desarrollo de resistencias. En nuestro ensayo esto no pudo comprobarse por cuanto no se detectaron prácticamente aislados resistentes a la colistina en ninguno de los tres grupos de tratamiento ensayado. En cuanto a la detección de aislados de sensibilidad intermedia, como ya se ha dicho, se produjo un incremento sustancial después de la administración de colistina en los tres grupos tratados, observándose un porcentaje mayor de aislados de sensibilidad intermedia en el grupo tratado con la dosis sub-terapéutica (5mg/kg/día) que en los otros dos grupos (43,3% vs. 20% y 20%, tabla 6). Y si bien las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas ($P=0,063$), no creemos que deba descartarse el hecho de que la exposición a una dosis de colistina inferior a la terapéutica de lugar a la aparición de aislados de sensibilidad intermedia en mayor medida que la exposición a dosis terapéuticas o superiores.

La aparición de aislados de *E. coli* resistentes a la colistina es poco frecuente debido al potente efecto bactericida que tienen las polimixinas sobre los microorganismos gram-negativos. La resistencia a las polimixinas suelen estar relacionada con modificaciones en el lípido A de la membrana externa, elemento de los lipopolisacáridos con el que interactúan estos antimicrobianos para llevar a cabo su acción, y esas modificaciones están a su vez mediadas

por los complejos sistemas de regulación PmrA/PmrB y PhoP/PhoQ (Tran *et al.*, 2005a; Falagas *et al.*, 2010). Siendo este el mecanismo principal de resistencia frente a polimixinas, cabría pensar que tal vez el incremento del porcentaje de aislados de sensibilidad intermedia detectado en este trabajo tras la administración de colistina, podría deberse al hecho de que la administración por vía oral del antibiótico de alguna forma iniciara la activación de estos sistemas de regulación y con ello se produjese alguna variación en la estructura de los lipopolisacáridos de membrana, provocándose de esta forma una interacción menor entre la membrana externa y el antibiótico polipeptídico y disminuyendo así la sensibilidad de los aislados de *E. coli* a la colistina.

4.2.2 RESULTADOS DE SENSIBILIDAD A AMOXICILINA.

4.2.2A Resultados de sensibilidad a amoxicilina del total de los aislados de *E. coli*.

Como puede observarse en la tabla 5, antes de iniciar la administración de colistina, el índice de aislados resistentes a amoxicilina fue muy elevado (89,2%). Este alto porcentaje de resistencia concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos realizados en aislados de *E. coli* procedentes tanto de cerdos con diarrea y edema como de animales sanos, en los que los niveles de resistencia a β -lactámicos oscilaron entre un 66 y un 92% (Mateu y Martin, 2000; van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Lim *et al.*, 2007). Tras la administración del antibiótico, el porcentaje de aislados resistentes se mantuvo en valores similares a los de la primera etapa, aunque cuatro semanas después de haber finalizado la administración de colistina, los niveles de resistencia descendieron aproximadamente un 30 % (tabla 5). No se detectaron aislados de sensibilidad intermedia en ninguna de las tres etapas.

4.2.2B. Resultados de sensibilidad a amoxicilina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.

Antes de la administración de colistina, el 77,5% de los aislados obtenidos de los animales de este grupo de tratamiento fueron resistentes a amoxicilina (tabla 7), valor que concuerda con los porcentajes de resistencias publicados por los autores citados en el apartado anterior. En la etapa fin de tratamiento, estos niveles de resistencia se incrementaron (96,7%) y volvieron a descender (66,7%) cuatro semanas después de haber finalizado la administración de colistina.

4.2.2C. Resultados de sensibilidad a amoxicilina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina.

Todos los aislados de *E. coli* que se obtuvieron de los animales de este grupo de tratamiento antes de iniciar la administración de colistina fueron resistentes a amoxicilina. Este valor, superior a los porcentajes de resistencia que encontramos en la bibliografía ya citada, se mantuvo al finalizar la administración de colistina y descendió en un 50% cuatro semanas después de haber finalizado el tratamiento (tabla 7).

4.2.2D. Resultados de sensibilidad a amoxicilina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina.

Los niveles iniciales de resistencia a amoxicilina en los aislados procedentes de este grupo de tratamiento fueron elevados (tabla 7), aunque similares a los datos bibliográficos consultados. Sin embargo, al administrar esta dosis de colistina, la evolución de las resistencias fue

Tabla 7. Sensibilidad a amoxicilina de los aislados de *E. coli* procedentes de las tres etapas del ensayo según la dosis de colistina administrada.

Etapas del ensayo	Dosis de colistina								
	5 mg/Kg/día			10 mg/Kg/día			15 mg/Kg/día		
	R**	I	S	R	I	S	R	I	S
AT* %									
(n [#] =120; n ₁ =40, n ₂ =40, n ₃ = 40)	77,5	0	22,5	100	0	0	90,0	0	10,0
FT %									
(n=110; n ₁ =30, n ₂ =40, n ₃ = 40)	96,7	0	3,3	100	0	0	75,0	0	25,0
PT %									
(n=70; n ₁ =30, n ₂ =10, n ₃ = 30)	66,7	0	33,3	50,0	0	50,0	66,7	0	33,3

* AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

**R: resistente; I: sensibilidad intermedia; S: sensible.

[#]n: número total de aislados por etapa; n₁, n₂ y n₃ se refieren al número de aislados por grupo de tratamiento.

diferente a lo que se había observado en los otros grupos de tratamiento, ya que el porcentaje de aislados resistentes descendió en la etapa fin de tratamiento (75%) y continuó descendiendo cuatro semanas después de haber finalizado la administración de colistina (tabla 7).

En todos los grupos de tratamiento se detectó un índice de resistencia a amoxicilina muy elevado antes de iniciar la administración de colistina, lo que dificulta el estudio de la evolución de las resistencias a este β -lactámico, así como el análisis de la posible influencia que la administración de colistina pudiera tener sobre la resistencia a amoxicilina. Sin embargo, parece que independientemente de la dosis administrada, los niveles iniciales de resistencia tienden a mantenerse más o menos estables al finalizar la administración del antibiótico y descienden en la fase post-tratamiento, siendo este descenso más marcado en los aislados procedentes del grupo de animales que recibieron 10 mg/kg/día de colistina, donde esta disminución fue del 50%. Sin embargo, es posible que este descenso tan marcado se deba al hecho de que en este grupo de tratamiento únicamente se obtuvieron aislados de *E. coli* de un animal en la etapa post-tratamiento, por lo que el valor puede resultar poco representativo y es posible que el índice de resistencia a amoxicilina en esta fase hubiera sido semejante al detectado en el resto de los grupos si el número de aislados de *E. coli* obtenidos hubiera sido superior.

Los porcentajes de resistencia tan elevados que se observaron en todos los grupos de tratamiento no resultan sorprendentes si tenemos en cuenta que los microorganismos gram negativos como *E. coli* presentan una cierta resistencia natural a los β -lactámicos gracias a la capa de lipopolisacáridos que forman la membrana celular y que al rodear la pared celular dificultan la llegada de estos antibióticos a su diana de acción: las enzimas transpeptidasas de la pared celular, más conocidas como proteínas de unión a penicilinas, PBPs o *penicillin-binding proteins* (Guardabassi y Courvalin, 2006). No obstante, es muy posible que los altos índices de resistencia detectados en este trabajo no se deban únicamente a la resistencia natural que los gram-negativos como de *E. coli* poseen frente a los β -lactámicos, sino también a la presencia de enzimas β -lactamasas que contribuyen a incrementar la resistencia frente a los β -lactámicos como la amoxicilina y que, tal y como se expone en el siguiente apartado, se detectaron en gran medida entre los aislados de *E. coli* obtenidos a lo largo de nuestro estudio.

4.2.2E. Detección de genes implicados en la resistencia a β -lactámicos.

Por técnicas de PCR múltiple se analizó la presencia de tres genes relacionados con la aparición de resistencias frente a β -lactámicos a través de la síntesis de β -lactamasas: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{OXA-1}. En este estudio se detectaron un total de 251 aislados resistentes a amoxicilina, considerándose todos ellos como aislados altamente resistentes, ya que sus halos de inhibición fueron de 9 mm (valor mínimo). La presencia de los genes de resistencia a β -lactámicos se estudió en un total de 120 aislados procedentes del muestreo de los 251 aislados resistentes detectados a lo largo de nuestro ensayo (ver apartado 3.4.3.1 de material y métodos para más detalles acerca del muestreo realizado). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Frecuencia de detección de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} y *bla*_{SHV} en la selección de aislados de *E. coli* resistentes a amoxicilina procedentes de las tres etapas del ensayo.

Gen de resistencia	Etapas del ensayo			
	AT* %	FT %	PT %	Total
	(n=51)	(n=47)	(n=22)	(n=120)
<i>bla</i> _{OXA-1}	0	0	0	0
<i>bla</i> _{TEM}	100	100	100	100
<i>bla</i> _{SHV}	0	0	0	0

*AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

Todos los aislados incluidos en el análisis fueron positivos únicamente al gen *bla*_{TEM} y, por tanto, no se detectaron aislados portadores de los genes *bla*_{SHV} ni *bla*_{OXA-1} (tabla 8). Estos resultados coinciden con los índices de detección del gen *bla*_{TEM} encontrados en otros estudios realizados con estirpes de *E. coli* en los que se han descrito porcentajes de aislados positivos a este gen que oscilan entre el 75 y el 88 % (Colom *et al.*, 2003; Maynard *et al.*, 2003; Kaye *et al.*, 2004). Sin embargo, no hemos encontrado referencias previas en las que el 100% de los aislados analizados fueran positivos únicamente a este gen, ya que otros autores también detectaron en los aislados de *E. coli* estudiados el gen *bla*_{SHV} (con porcentajes de detección que oscilaron entre el 3,9% y el 21%) y el gen *bla*_{OXA} (con porcentajes entre el 1,9% y el 5%) (Colom *et al.*, 2003; Maynard *et al.*, 2003). En cualquier caso, en estos estudios las β -lactamasas detectadas con mayor frecuencia fueron las β -lactamasas TEM y nuestros resultados corroborarían el hecho de que este tipo de enzimas inhibidoras de los β -lactámicos son las que con mayor frecuencia están relacionadas con resistencias frente a este grupo de antimicrobianos en *E. coli* (Colom *et al.*, 2003).

4.2.3. RESULTADOS DE SENSIBILIDAD A DOXICICLINA.

4.2.3A. Resultados de sensibilidad a doxiciclina del total de los aislados de *E. coli*.

Los porcentajes de resistencia frente a doxiciclina detectados en los aislados de *E.coli* en las tres etapas en que se dividió el ensayo se muestran en la tabla 5. Tal y como puede observarse en dicha tabla, antes de iniciar el tratamiento con colistina el 92,5% de los aislados fueron resistentes a doxiciclina. Este resultado coincide con los altos índices de resistencia a este antibiótico encontrados por Jiang *et al.* (2009) en cepas de *E. coli* aisladas de cerdos sanos y enfermos y también es similar al porcentaje de resistencia a tetraciclina detectado en estirpes aisladas de cerdos sanos por otros autores (Lim *et al.*, 2007). La administración de colistina no pareció influir en el porcentaje de aislados de *E. coli* resistentes a doxiciclina, ya que el valor de resistencia encontrado en las diferentes etapas se mantuvo sin grandes cambios (tabla 5).

4.2.3B. Resultados de sensibilidad a doxiciclina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.

Como se muestra en la tabla 9, antes de iniciar la administración de colistina el 90% de los aislados de *E.coli* fueron resistentes a doxiciclina y este porcentaje se mantuvo sin grandes cambios a lo largo de las tres etapas del ensayo, experimentando un ligero incremento en la etapa fin de tratamiento, donde el 100% de los aislados de *E. coli* fueron resistentes a esta tetraciclina (tabla 9).

4.2.3C. Resultados de sensibilidad a doxiciclina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina.

El 100% de los aislados de *E. coli* procedentes de los cerdos tratados con 10 mg/kg/día de colistina fueron resistentes a doxiciclina en las tres etapas en las que se dividió el ensayo (tabla 9). Jiang *et al.* (2009) también describieron un 100% de resistencia a este antibiótico en estirpes de *E. coli* aisladas de cerdos sanos y enfermos, aunque los índices de resistencia a tetraciclina observados por otros autores en aislados procedentes de cerdos sanos como los de nuestro estudio no fueron tan elevados (Lim *et al.*, 2007; Enne *et al.*, 2008).

4.2.3D. Resultados de sensibilidad a doxiciclina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina.

Antes de iniciar la administración del antibiótico, se observó un índice de resistencia del 87,5% en los aislados de este grupo de tratamiento (tabla 9), siendo este porcentaje elevado pero menor que el observado en el resto de los grupos de tratamiento. Al finalizar la administración

Tabla 9. Sensibilidad a doxiciclina de los aislados de *E. coli* procedentes de las tres etapas del ensayo según la dosis de colistina administrada.

Etapas del ensayo	Dosis de colistina								
	5 mg/Kg/día			10 mg/Kg/día			15 mg/Kg/día		
	R**	I	S	R	I	S	R	I	S
AT* %									
(n [#] =120; n ₁ =40, n ₂ =40, n ₃ = 40)	90,0	10,0	0	100	0	0	87,5	0	12,5
FT %									
(n=110; n ₁ =30, n ₂ =40, n ₃ = 40)	100	0	0	100	0	0	75,0	0	25,0
PT %									
(n=70; n ₁ =30, n ₂ =10, n ₃ = 30)	96,7	0	3,3	100	0	0	66,7	3,3	30,0

*AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

**R: resistente; I: sensibilidad intermedia; S: sensible.

[#] n: número total de aislados por etapa; n₁, n₂ y n₃ se refieren al número de aislados por grupo de tratamiento.

de colistina, el índice de resistencia a doxiciclina disminuyó en aproximadamente un 12% y continuó disminuyendo en la etapa post-tratamiento, donde se alcanzó el menor porcentaje

de resistencia a doxiciclina observado en este ensayo en todas las etapas y grupos de tratamiento (tabla 9).

Los resultados obtenidos en este ensayo no permiten determinar si la administración de colistina puede ejercer alguna influencia sobre el grado de resistencia a doxiciclina de las estirpes de *E. coli* aisladas del contenido intestinal de cerdos tratados con este antimicrobiano, ya que, al igual que en los estudios previos realizados en cerdos citados con anterioridad, el porcentaje inicial de aislados resistentes a este antibiótico fue muy elevado y este índice de resistencia no sufrió modificaciones destacables a lo largo de las tres etapas en ninguno de los tres grupos de tratamiento.

4.2.3E. Detección de genes implicados en la resistencia a tetraciclinas.

En el presente estudio se detectaron un total de 203 aislados resistentes a doxiciclina, de los cuales 81 se consideraron como altamente resistentes (halo de inhibición = 9). En el análisis de los genes de resistencia a tetraciclinas se incluyeron todos los aislados altamente resistentes y 18 aislados resistentes (halo de inhibición > 9 mm y ≤ 14 mm) seleccionados aleatoriamente (ver apartado 3.4.2.1 de Material y Métodos) entre los 122 aislados de *E. coli* resistentes a doxiciclina detectados en el ensayo. Los genes relacionados con la aparición de resistencias a tetraciclinas que se analizaron fueron: *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(M)*. Los dos primeros están relacionados con la aparición de bombas de flujo y el tercero con la protección de la diana ribosómica. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 10.

Todos los aislados estudiados fueron positivos al menos a uno de los genes analizados. El gen que se detectó con mayor frecuencia fue el *tet(A)*, ya que el 87,9 % del total de los aislados portaban este gen sólo o en combinación con otros genes de resistencia a tetraciclinas. En la etapa inicial, el gen mayoritario también fue el *tet(A)*: el 60% de los aislados resistentes y el

Tabla 10. Frecuencia de detección de los genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(M)* en los aislados de *E. coli* resistentes y altamente resistentes a doxiciclina seleccionados en las tres etapas del ensayo.

Gen de resistencia	Etapa del ensayo						Total (n=99)
	AT*		FT		PT		
	R**	AR	R	AR	R	AR	
	% (n=5)	% (n=44)	% (n=7)	% (n=34)	% (n=6)	%(n=3)	
tet(A)	60 (3)	54,5 (24)	71,4 (5)	32,3 (11)	16,6 (1)	66,6 (2)	46,5 (46)
Tet(B)	20 (1)	25 (11)	0	0	0	0	12,1 (12)
tet(A) + tet(B)	20 (1)	20,4 (9)	28,5 (2)	29,4 (10)	83,3 (5)	33,3 (1)	28,3 (28)
tet(A) + tet(M)	0	0	0	32,3 (11)	0	0	11,1 (11)
tet(A) + tet(B) + tet(M)	0	0	0	5,8 (2)	0	0	2 (2)

*AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

**R: aislados resistentes; AR: aislados altamente resistentes.

54,5% de los aislados altamente resistentes correspondientes a esta etapa eran portadores de este gen. En la etapa fin de tratamiento no hubo ningún aislado en el que se detectase únicamente el gen *tet(B)* y entre los aislados resistentes, el gen *tet(A)* siguió siendo el detectado con más frecuencia (tabla 10). Sin embargo, cabe destacar que entre los aislados altamente resistentes encontramos altos porcentajes de aislados de *E. coli* en los que el gen

tet(A) se presentaba asociado a los otros genes de resistencia a doxiciclina como el gen *tet(B)* (29,4%) y el gen *tet(M)* (32,3%), detectándose la presencia simultánea de los tres genes de resistencia en dos (5,8%) de los aislados de esta etapa. En la fase post-tratamiento, la asociación de los genes *tet(A)* y *tet(B)* fue la más frecuente dentro de los aislados resistentes, mientras que en los aislados altamente resistentes el gen *tet(A)* volvió a ser el predominante (Tabla 10).

Debemos señalar que el gen de resistencia a tetraciclinas *tet(M)* sólo se detectó en la etapa fin de tratamiento y en aislados altamente resistentes a doxiciclina. Por otra parte, los únicos dos aislados en los que se detectaron los tres genes de forma simultánea pertenecían también a esta etapa y además eran aislados altamente resistentes a esta tetraciclina.

Según nuestros resultados, el gen *tet(A)* sólo o con otros genes *tet* asociados, es el detectado con mayor frecuencia entre los aislados de *E. coli* analizados. Estos datos concuerdan con los resultados de los estudios realizados con aislados de *E. coli* procedentes de cerdos diarreicos y de cerdos sanos y diarreicos realizados por Lanz *et al.* (2003) y por Sengeløv *et al.* (2003) respectivamente, así como con los datos aportados por estudios más recientes llevados a cabo con aislados de *E. coli* procedentes de cerdos sanos (Schwaiger *et al.*, 2010). Sin embargo, en otros estudios realizados con estirpes de *E.coli* enterotoxigénicas procedentes de cerdos con diarrea el gen *tet(B)* fue el mayoritario, detectándose en el 80 % de los aislados (Maynard *et al.*, 2003). Este gen fue también el predominante entre los aislados de *E. coli* procedentes de cerdos sanos analizados por Bryan *et al.* (2004) y por Kumai *et al.* (2005). Según Blake *et al.* (2003) la presencia mayoritaria de uno u otro gen podría estar relacionada con la exposición previa de los animales a antibióticos, ya que en su estudio en las cepas aisladas de cerdos procedentes de granjas libres de antibióticos el gen predominante fue el *tet(A)*, mientras que en las cepas aisladas de cerdos de granjas intensivas que empleaban antimicrobianos el gen que se detectó con mayor frecuencia fue el *tet(B)*. Nuestro estudio se realizó con cerdos no expuestos previamente a ningún tratamiento antibiótico, por lo que la mayor frecuencia de detección del gen *tet(A)* entre nuestros aislados parece concordar con la relación expuesta por Blake *et al.* (2003) entre el consumo de antibióticos y la frecuencia de detección de uno u otro gen de resistencia a tetraciclinas.

Los resultados de estudios previos realizados con aislados porcinos de *E. coli* en los que no se detectó una asociación entre los genes *tet(A)* y *tet(B)* o se detectó con frecuencias muy bajas (Lanz *et al.*, 2003; Sengelov *et al.*, 2003; Boerlin *et al.*, 2005; Schwaiger *et al.*, 2010) sugieren una asociación negativa entre estos dos genes. Los resultados obtenidos recientemente por Medina *et al.* (2011) en cepas de *E. coli* procedentes de rumiantes también apoyan la idea de una asociación negativa entre ambos genes. Igualmente, Schierack *et al.* (2009) en su estudio realizado con aislados de *E. coli* no patógenos de origen porcino pusieron de manifiesto la asociación negativa entre los genes *tet(A)* y *tet(B)*. Este hecho ha sido atribuido por algunos autores a una posible incompatibilidad plasmídica (Jones *et al.*, 1992; Boerlin *et al.*, 2005). Sin embargo, en nuestro estudio, la asociación entre los genes *tet(A)* y *tet(B)* se observó con frecuencia, ya que se detectó en 28 de los 99 aislados analizados (28,3%) (Tabla 6), resultado que no concuerda ni con los datos de los autores citados ni con la teoría de la incompatibilidad de plásmidos, por lo que, tal vez, cabría replantearse esta posible incompatibilidad descrita entre ambos genes de resistencia a tetraciclinas.

El gen *tet(M)* es uno de los genes de resistencia a tetraciclinas más detectado en aislados de enterococos (Aarestrup *et al.*, 2000; Huys *et al.*, 2004; Cauwerts *et al.*, 2007; Hummel *et al.*, 2007). Sin embargo, no es frecuente detectarlo en coliformes gram-negativos como *E. coli*. De hecho, este gen sólo se ha detectado en aislados de *E. coli* de origen porcino en dos estudios previos y en ambos casos las frecuencias de detección fueron muy bajas (Bryan *et al.*, 2004; Schwaiger *et al.*, 2010). En nuestro estudio, sin embargo, este gen se detectó en 13 de los 99 aislados (13,1 %) de *E. coli* resistentes a doxiciclina estudiados (tabla 6). Además, debemos destacar que todos estos aislados positivos a *tet(M)* procedían de la etapa fin de tratamiento, es decir, fueron aislados justo después del tratamiento con colistina. Otro dato relevante es que, hasta el momento, no se había detectado el gen *tet(M)* asociado con los genes *tet(A)* y *tet(B)* de forma conjunta y tan sólo en un estudio previo se describe la asociación del gen *tet(M)* con el gen *tet(A)* o con el gen *tet(B)* (Schwaiger *et al.*, 2010).

Como ya se ha comentado anteriormente, en bacterias gram-positivas como los enterococos, el gen *tet(M)* es muy frecuente entre los aislados resistentes a tetraciclinas y en estas bacterias

el gen *tet(M)* suele encontrarse asociado a los transposones Tn1545 y Tn916 (Agerso *et al.*, 2006). El que el gen *tet(M)* se encuentre en elementos génicos de alta movilidad junto con el hecho de que hayamos detectado este gen únicamente en aislados de *E. coli* procedentes de la fase final del tratamiento, nos llevó inicialmente a pensar que la presión selectiva ejercida por la administración de colistina podría promover de alguna manera la transferencia en el medio intestinal de este gen desde *Enterococcus spp.* a *E.coli*, actuando las bacterias gram-positivas como posible reservorio de este gen de resistencia para las bacterias gram-negativas. En el presente trabajo también se ha llevado a cabo un estudio de esta posible transferencia, realizando transmisiones *in vitro* del gen *tet(M)* y se ha profundizado en el análisis de los elementos genéticos asociados al gen *tet(M)* presentes en los aislados de *E.coli* donde se detectó este gen de resistencia. Los resultados de estos estudios se exponen en el apartado 4.5.

En cuanto a la posible relación existente entre la combinación de más de un gen de resistencia a tetraciclinas y el incremento en el nivel de resistencia a estos antibióticos, de acuerdo con nuestros resultados la combinación de los genes *tet(A)* y *tet(B)* no parece implicar un incremento en el nivel de resistencia, ya que esta combinación de genes se detectó tanto en aislados resistentes como en altamente resistentes sin diferencias apreciables. Estos datos parecen coincidir con los aportados por Bryan *et al.* (2004), quienes no encontraron en su estudio una asociación entre la combinación de más de un gen de resistencia a tetraciclinas y un incremento en el nivel de resistencia de los aislados. Sin embargo, en nuestro trabajo, los aislados que portaban el gen *tet(M)* y el gen *tet(A)* o el gen *tet(M)* y el gen *tet(A)* y *tet(B)* fueron altamente resistentes (tabla 6), lo que parece indicar que la asociación del gen *tet(M)* con otros genes sí podría estar relacionada con un aumento en los niveles de resistencia a doxiciclina. El mecanismo de resistencia para el que codifican *tet(A)* y *tet(B)* es el mismo (bombas de flujo), sin embargo, el gen *tet(M)* está implicado en la protección de la diana ribosómica, por lo que cabe pensar que, si bien la asociación de dos genes que codifican para un mismo mecanismo de resistencia a tetraciclinas en un mismo aislado de *E. coli* no parece producir un incremento en el nivel de resistencia a doxiciclina, sí podría hacerlo la asociación de genes implicados en diferentes mecanismos de resistencia a tetraciclinas.

4.2.4 RESULTADOS DE SENSIBILIDAD A GENTAMICINA.

4.2.4A. Resultados de sensibilidad a gentamicina del total de los aislados de *E. coli*.

El porcentaje de resistencia a gentamicina de los aislados de *E. coli* en la fase inicial fue del 37,5% (tabla 5), porcentaje muy elevado si se compara con los porcentajes de resistencia descritos en estudios previos realizados con aislados de *E. coli* procedentes de cerdos sanos o diarreicos y que oscilan entre el 2 y el 15% (van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Lanz *et al.*, 2003; Maynard *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007). Este porcentaje inicial de resistencia a gentamicina se incrementó significativamente ($p < 0,001$) en la etapa fin de tratamiento, donde un 90 % de los aislados fueron resistentes a este antibiótico (tabla 5). Sin embargo, cuatro semanas después de haber finalizado la administración de colistina, el índice de resistencia fue incluso inferior al detectado en la fase inicial (tabla 5), aunque continuó siendo superior a los porcentajes publicados en los estudios mencionados anteriormente.

Estos resultados podrían indicar que la administración por vía oral de colistina favorecería de alguna manera el incremento de la resistencia de *E. coli* a gentamicina, ya que el porcentaje de aislados resistentes aumentó significativamente después de la administración del antibiótico.

4.2.4B. Resultados de sensibilidad a gentamicina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.

Como se muestra en la tabla 11, antes de iniciar el tratamiento con colistina el 40% de los aislados fueron resistentes a gentamicina, porcentaje superior a los índices de resistencia publicados en los trabajos realizados en cerdos que se citaron en el apartado anterior. Este

Tabla 11. Sensibilidad a gentamicina de los aislados de *E. coli* procedentes de las tres etapas del ensayo según la dosis de colistina administrada.

Etapa del ensayo	Dosis de colistina								
	5 mg/Kg/día			10 mg/Kg/día			15 mg/Kg/día		
	R**	I	S	R	I	S	R	I	S
AT* %									
(n [#] =120; n ₁ =40, n ₂ =40, n ₃ = 40)	40,0	2,5	57,5	47,5	5	47,5	25,0	5,0	70,0
FT %									
(n=110; n ₁ =30, n ₂ =40, n ₃ = 40)	96,7	0	3,3	100	0	0	75,0	0	25,0
PT %									
(n=70; n ₁ =30, n ₂ =10, n ₃ = 30)	3,3	3,3	93,3	50,0	0	50,0	36,7	0	63,3

*AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

**R: resistente; I: sensibilidad intermedia; S: sensible.

[#] n: número total de aislados por etapa; n₁, n₂ y n₃ se refieren al número de aislados por grupo de tratamiento.

porcentaje de resistencia se vio incrementado significativamente ($p < 0,0001$) tras la administración de colistina (96,7 %) y, sin embargo, cuatro semanas después de haber finalizado el tratamiento, el porcentaje de aislados de *E. coli* resistentes a gentamicina fue únicamente del 3,3 %, muy inferior al detectado en las otras etapas (tabla 11).

Estos resultados concuerdan con el comportamiento observado al analizar los porcentajes de resistencia sin considerar la dosis administrada de colistina y, como se comentó antes, parecen indicar que la administración de esta dosis de colistina favorecería de alguna manera el incremento de la resistencia de *E. coli* a gentamicina, aunque este efecto no se prolongaría en el tiempo, puesto que un mes después de haber realizado el tratamiento con colistina los índices de resistencia fueron incluso inferiores a los de la etapa inicial.

4.2.4C. Estudio de sensibilidad a gentamicina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina.

Los niveles de resistencia a gentamicina detectados en los aislados de este grupo de tratamiento antes de iniciar la administración de colistina fueron elevados (47,5 %, tabla 11).

Este porcentaje se incrementó también significativamente ($p < 0,0001$) en la etapa fin de tratamiento, donde el 100% de los aislados de *E. coli* fueron resistentes a este aminoglucósido. Sin embargo, como se muestra en la tabla 11, cuatro semanas después de haber finalizado la administración de colistina, el porcentaje de resistencia a gentamicina fue similar al detectado antes de iniciar el tratamiento (50%), si bien hay que tener en cuenta que en esta etapa sólo se consiguieron aislamientos de uno de los 4 animales.

Los resultados en este grupo de tratamiento siguieron, pues, un modelo similar al descrito en los apartados anteriores, si bien no se apreció un descenso tan notable en el porcentaje de aislados resistentes a gentamicina en la etapa post-tratamiento como el visto en el grupo tratado con 5 mg/kg/día de colistina.

4.2.4D. Resultados de sensibilidad a gentamicina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina.

El 25% de los aislados de *E. coli* obtenidos del grupo de animales medicados con 15 mg/kg/día de colistina antes de iniciar el tratamiento fueron resistentes a gentamicina (tabla 11). Este dato sigue siendo ligeramente superior a los porcentajes de resistencia publicados previamente por los autores mencionados antes, aunque inferior al observado en los otros grupos de tratamiento. Inmediatamente después de finalizar la administración de colistina, como en los casos anteriores, se encontró un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,0001$) del porcentaje de resistencias, que alcanzó un 75%. En la etapa post-tratamiento, el valor del porcentaje de aislados resistentes fue ligeramente superior al encontrado antes de iniciar el tratamiento (36,7 % *versus* 25 %, tabla 11).

Los resultados en este grupo de tratamiento también siguieron un modelo análogo al descrito en los apartados anteriores, aunque el porcentaje de resistencia de los aislados procedentes de este grupo tras la administración de colistina fue inferior a los observados en los aislados de los otros grupos de tratamiento (Tabla 11).

La relación entre la medicación con colistina y el incremento en las resistencias frente a gentamicina tras el tratamiento induce a pensar que entre estos dos antibióticos puede darse algún fenómeno de resistencia cruzada. Tanto los aminoglucósidos como las polimixinas son antibióticos policatiónicos y ambos interactúan del mismo modo con los compuestos aniónicos

de la membrana externa de los gram negativos (fosfolípidos y lipopolisacáridos) desplazando a los iones divalentes de calcio y magnesio e incrementando con ello la permeabilidad de la membrana (Rahaman *et al.*, 1998; García de Lomas *et al.*, 1999). En este trabajo se han detectado pocos aislados de *E. coli* resistentes a colistina, pero sí se encontraron un porcentaje considerable de aislados de sensibilidad intermedia que además aumentaron tras la administración de la colistina. Por tanto, es posible que la administración de colistina condujese a la activación en *E. coli* del sistema regulador PmrA/PmrB implicado en la resistencia a polimixinas (Falagas *et al.*, 2010) y esto provocase cambios en la estructura de los lipopolisacáridos de la membrana externa que habrían dificultado la interacción de la gentamicina con la membrana y por tanto la llegada de este antibiótico a su diana de acción, explicando la relación entre la administración de colistina y el aumento en el índice de resistencia de *E. coli* a gentamicina observado en este trabajo. De hecho, los resultados de otros autores parecen corroborar esta hipótesis. Así, Li *et al.* (2005) también pusieron de manifiesto la relación existente entre la resistencia frente a polimixinas y aminoglucósidos determinando que la proteína de la membrana externa OprH, cuya expresión se ve incrementada con niveles bajos del ión magnesio, podría estar relacionada con la aparición de resistencias frente a polimixina B y gentamicina en *Pseudomonas aeruginosa*. Por otra parte, Rahaman *et al.* (1998) detectaron niveles de resistencia a gentamicina elevados en un mutante de *E. coli* resistente a polimixina B obtenido en su laboratorio y concluyeron que los cambios observados en este mutante a nivel de los lipopolisacáridos y las proteínas de la membrana externa provocaron un descenso en la permeabilidad de la membrana que a su vez desencadenó un incremento en el nivel de resistencia del mutante frente a gentamicina.

4.2.4E. Detección de genes implicados en la resistencia a aminoglucósidos.

La aparición de resistencias en enterobacterias frente a aminoglucósidos se debe principalmente a la acción de enzimas capaces de modificar la estructura química de estos antibióticos (Vanhoof *et al.*, 1992). Estas enzimas se clasifican en tres grandes grupos según la acción enzimática que producen: acetiltransferasas (AAC), nucleotidiltransferasas o

adeniltransferasas (ANT) y fosfotransferasas (APH). En nuestro estudio, se analizaron por PCR los genes *ant(2'')-Ia* (también denominado *aadB*), *aac(3)-IIa* y *aac(3)-IVa* que codifican para las enzimas ANT(2''), AAC(3)-II y AAC(3)-IV respectivamente (Vanhoof *et al.*, 1992; Shaw *et al.*, 1993; Sandvang y Aarestrup, 2000). La presencia de estos genes se estudió en una muestra de 84 aislados seleccionada tal y como se detalla en el apartado 3.4.4.1 de Material y Métodos y que incluía tanto aislados considerados como altamente resistentes (halo de inhibición = 9) como aislados considerados como resistentes (halo de inhibición > 9 mm y ≤ 12 mm).

Los resultados del estudio de genes de resistencia a aminoglucósidos se resumen en la tabla 12.

Como puede apreciarse en la tabla, no se detectó ninguno de los genes de resistencia analizados en 7 aislados. De estos 7 aislados, 6 eran resistentes a gentamicina y uno altamente resistente. De los 6 aislados resistentes que no portaban ninguno de los genes estudiados, uno se obtuvo en la fase antes del tratamiento y otro en la etapa post-tratamiento, mientras que el aislado altamente resistente se aisló en la etapa fin de tratamiento.

En ninguno de los aislados de *E.coli* analizados se detectó el gen *ant(2'')-Ia* (también conocido como *aadB*), que codifica para la enzima adeniltransferasa ANT(2''). Esta enzima está relacionada con la aparición de resistencias frente a diferentes aminoglucósidos entre los que se encuentra la gentamicina y en estudios previos realizados en ganado porcino este gen se detectó en aproximadamente el 37% de los aislados de *E. coli* analizados (Sandvang y Aarestrup, 2000), describiéndose como uno de los genes que con mayor frecuencia da lugar a resistencia a gentamicina en *E. coli*.

Como puede observarse en la tabla 12, tampoco se detectó ningún aislado que fuese positivo únicamente para el gen *aac(3)-IVa*, ya que el aislado en el que se detectó este gen de resistencia era también portador del gen *aac(3)-IIa*. Este aislado era altamente resistente a gentamicina y procedía de la etapa fin de tratamiento. Este resultado discrepa con lo

Tabla 12. Frecuencia de detección de los genes *aac(3)-II*, *aac(3)-IV* y *ant(2'')-I* en la selección de aislados resistentes a gentamicina.

Gen de resistencia	Etapas del ensayo			
	AT*	FT	PT	Total
	% (n=24)	% (n=50)	% (n=10)	% (n=84)
<i>aac(3)-IV</i>	0	0	0	0
<i>aac(3)-II</i>	95,8 (23)	96(48)	50 (5)	90,5 (76)
<i>ant(2'')-I</i>	0	0	0	0
<i>aac(3)-II + aac(3)-IV</i>	0	2 (1)	0	1,2 (1)
<i>Ningún gen</i>	4,2 (1)	2 (1)	50 (5)	8,3 (7)

* AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

encontrado por Maynard *et al.* (2003) quienes detectaron este gen en el 75 % de los aislados de *E. coli* resistentes a gentamicina que analizaron, siendo este porcentaje muy superior al detectado en este trabajo. Del mismo modo, Sandvang y Aarestrup (2000) encontraron este gen en 6 de los 27 aislados de *E. coli* de origen porcino incluidos en su estudio.

El gen detectado con mayor frecuencia en nuestro estudio fue el *aac(3)-IIa*, ya que el 90,5% de los aislados de *E. coli* portaban únicamente este gen que codifica para la acetiltransferasa AAC(3)-II y en otro aislado se encontró este gen junto con el gen *aac(3)-IVa* (tabla 12). Estos porcentajes de detección tan elevados discrepan con los descritos en estudios previos realizados con aislados de *E. coli* en los que o no se detectó este gen, o los porcentajes de detección fueron significativamente inferiores (Sandvang y Aarestrup, 2000; Maynard *et al.*,

2003). Sin embargo, otros autores como Över *et al.* (2001) señalan a este gen como el detectado con más frecuencia en aislados de *E. coli* resistentes a varios aminoglucósidos como la gentamicina.

4.2.5 RESULTADOS DE SENSIBILIDAD A ENROFLOXACINA.

4.2.5A. Resultados de sensibilidad a enrofloxacin del total de los aislados de *E. coli*.

Antes de iniciar el tratamiento con colistina, el 15% de los aislados de *E.coli* fueron resistentes a enrofloxacin (tabla 5). Este resultado contrasta con lo hallado en algunos estudios realizados con estirpes de *E.coli* procedentes de cerdos sanos y afectados de diarrea y edema en los que no se detectó ningún aislado resistente a esta quinolona (Kijima-Tanaka *et al.*, 2003; Lanz *et al.*, 2003). Por el contrario, en un estudio realizado por Mateu y Martín (2000) con aislados de *E. coli* procedentes de cerdos con diarrea o edema el porcentaje de aislados sensibles a enrofloxacin fue de un 27,4%, detectando un 11,9% de aislados de sensibilidad intermedia, lo que significa que el índice de resistencias que encontraron estos autores fue superior al registrado en nuestro estudio.

Inmediatamente después de acabar la administración de colistina, no se detectó aislado alguno que fuera resistente a enrofloxacin (tabla 5). Sin embargo, cuatro semanas después de haber finalizado el tratamiento, el 4,3% de los aislados de *E.coli* fueron resistentes a esta quinolona.

Analizando los porcentajes de aislados de *E. coli* de sensibilidad intermedia a enrofloxacin, se aprecia que el porcentaje en la etapa fin de tratamiento (30%) aumenta con respecto al de la fase inicial (6,7%), descendiendo de nuevo en la fase post-tratamiento a un valor ligeramente

superior al detectado antes de iniciar la administración de colistina (12,9%). Estos resultados parecen indicar que el tratamiento con colistina, de alguna forma, induce un descenso en el grado de sensibilidad a enrofloxacin, ya que el recuento de aislados de sensibilidad intermedia se incrementó tras la administración por vía oral de este antibiótico.

4.2.5B. Resultados de sensibilidad a enrofloxacin de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.

Como se muestra en la tabla 13, antes de iniciar la administración de colistina el 5% de los aislados de *E.coli* fueron resistentes a enrofloxacin. En este grupo de tratamiento no se detectaron aislados de *E. coli* resistentes a enrofloxacin ni en la etapa fin de tratamiento ni en la post-tratamiento (tabla 13). Sin embargo, las frecuencias de aislados de sensibilidad intermedia a enrofloxacin siguieron un comportamiento interesante a lo largo de las tres etapas del ensayo, ya que, como se observa en la tabla 13, en la etapa inicial no se detectaron aislados de sensibilidad intermedia y, sin embargo, al finalizar el tratamiento con colistina un 40% de los aislados presentaban sensibilidad intermedia a esta quinolona, manteniéndose este porcentaje sin grandes cambios (30%) en la etapa post-tratamiento.

4.2.5C. Resultados de sensibilidad a enrofloxacin de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina.

El índice de resistencia observado antes de iniciar el tratamiento con colistina fue bajo (2,5 %, tabla 13). En la etapa fin de tratamiento no se detectaron aislados de *E. coli* resistentes a enrofloxacin, al igual que ocurrió en la etapa post-tratamiento (Tabla 13). En cuanto a la evolución de los aislados de sensibilidad intermedia, también en este grupo de tratamiento se

Tabla 13. Sensibilidad de los aislados de *E. coli* a enrofloxacin a lo largo de las tres etapas del ensayo según la dosis de colistina administrada.

Etapas del ensayo	Dosis de colistina								
	5 mg/Kg/día			10 mg/Kg/día			15 mg/Kg/día		
	R**	I	S	R	I	S	R	I	S
AT* %									
(n [#] =120; n ₁ =40, n ₂ =40, n ₃ = 40)	5,0	0	95,0	2,5	5,0	92,5	37,5	15,0	47,5
FT %									
(n=110; n ₁ =30, n ₂ =40, n ₃ = 40)	0	40,0	60,0	0	27,5	72,5	0	25,0	75,0
PT %									
(n=70; n ₁ =30, n ₂ =10, n ₃ = 30)	0	30,0	70,0	0	0	100	10,0	0	90,0

*AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

**R: resistente; I: sensibilidad intermedia; S: sensible.

[#] n: número total de aislados por etapa; n₁, n₂ y n₃ se refieren al número de aislados por grupo de tratamiento.

observó un incremento en el recuento de estos aislados en la etapa fin de tratamiento, no detectándose ningún aislado de *E. coli* de sensibilidad intermedia a enrofloxacin en la etapa

post-tratamiento, etapa en la que el 100% de los aislados fueron sensibles a esta quinolona (tabla 13).

4.2.5D. Resultados de sensibilidad a enrofloxacin de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina.

El 37,5% de los aislados de *E.coli* de la etapa inicial fueron resistentes a enrofloxacin, siendo este porcentaje muy superior a los índices de resistencia iniciales observados en los otros dos grupos de tratamiento (tabla 13). En la etapa fin de tratamiento no se detectó ningún aislado de *E.coli* resistente a enrofloxacin. Sin embargo, el índice de resistencias fue del 10% en la etapa post-tratamiento. En cuanto al porcentaje de aislados de sensibilidad intermedia, el valor inicial se incrementó discretamente en la etapa fin de tratamiento y no se detectó ningún aislado de sensibilidad intermedia cuatro semanas después de haber finalizado la administración de colistina (tabla 13).

En resumen, todos estos resultados coinciden con el comportamiento observado al analizar la evolución de los niveles de resistencia a enrofloxacin sin tener en cuenta la dosis de colistina administrada y, por tanto, no parece que los diferentes tratamientos con este antibiótico influyan en la generación de resistencia a enrofloxacin en aislados de *E. coli*, puesto que al finalizar el tratamiento con colistina no se detectaron en ningún grupo aislados resistentes a esta quinolona. No obstante, debemos tener en cuenta que el índice de aislados de *E.coli* resistentes a quinolonas suele ser bajo debido a la eficacia bactericida que poseen estos antibióticos sobre microorganismos gram-negativos y concretamente sobre los miembros del género *Enterobacteriaceae* (Lees y Shojaee AliAbadi, 2002; Gobernado, 2003). Sin embargo, también de forma independiente a la dosis de colistina administrada, el índice de aislados de sensibilidad intermedia aumentó en la fase fin de tratamiento y descendió cuatro semanas después de haber finalizado la administración del antibiótico, lo cual induce a pensar que, pese a no aparecer aislados resistentes como consecuencia de la administración de colistina, el tratamiento con este antibiótico, de alguna forma, induce una disminución en el grado de sensibilidad a esta quinolona. El mecanismo de acción de la colistina se basa en la interacción

con los lipopolisacáridos y fosfolípidos de la membrana externa, lo que ocasiona una alteración estructural de esta membrana conduciendo a un incremento en la permeabilidad de la misma (Mascaretti, 2003a). Por otra parte, para que las quinolonas lleguen a su diana de acción (las topoisomerasas) deben atravesar la membrana externa a través de la porina OmpF (Mascaretti, 2003c). Por este motivo, es posible que la exposición a colistina ocasione una alteración de la membrana externa que dificulte la entrada de la enrofloxacin al interior de la célula bacteriana, disminuyéndose así la sensibilidad frente al antibiótico en los aislados de *E. coli* y produciéndose, por tanto, un incremento en el recuento de aislados de sensibilidad intermedia detectados en la etapa fin de tratamiento.

4.2.5E. Detección de mecanismos de resistencia a quinolonas.

En las bacterias gram-negativas como *E. coli*, las resistencias frente a quinolonas suelen estar relacionadas con la aparición de mutaciones en la región QRDR (acrónimo del inglés “quinolone resistance-determining region”) del gen *gyrA* de la ADN girasa (también denominada topoisomerasa II) y del gen *parC* de la topoisomerasa IV (Hooper, 2001; Mascaretti, 2003). En los últimos años también se ha detectado en *E. coli* otro mecanismo de resistencia a través de plásmidos portadores de los genes *qnr* (*qnrA* o *qnrB*) que codifican proteínas capaces de bloquear la acción de las quinolonas sobre la ADN girasa y la topoisomerasa IV, dando lugar a aislados con bajos niveles de resistencia frente a estos antimicrobianos (Mammeri *et al.*, 2005; Robicsek *et al.*, 2006b).

En este estudio se analizaron las posibles mutaciones tanto en el gen *gyrA* de la ADN girasa como en el gen *parC* de la topoisomerasa IV. Este análisis se llevó a cabo en todos los aislados altamente resistentes (15 aislados) y resistentes (6 aislados) detectados a lo largo del ensayo. Se consideraron aislados altamente resistentes aquellos en los que el halo de inhibición tuvo el valor mínimo (halo = 9 mm) y aislados resistentes aquellos cuyo halo de inhibición fue > 9 mm y ≤ 16 mm.

Como se detalló en el apartado correspondiente de Material y Métodos, los fragmentos de los genes *gyrA* y *parC* amplificados por PCR se purificaron y las dos hebras de cada uno de los dos genes se secuenciaron empleando para ello los mismos oligonucleótidos usados en la PCR. Las secuencias obtenidas se compararon con las publicadas de las regiones QRDR de los genes *gyrA* y *parC* con el fin de detectar los cambios o mutaciones producidas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14.

Sólo en dos de los 21 aislados incluidos en el análisis no se detectaron mutaciones ni en el gen *gyrA* ni en el *parC*. Ambos aislados eran altamente resistentes y procedían de la fase post-tratamiento de un mismo animal. Además, en el análisis se encontró un aislado, también altamente resistente y procedente del mismo animal y de la misma fase que los aislados en los que no se detectó mutación alguna, en el que sólo se encontraron mutaciones en el gen *gyrA* y no en el gen *parC*. En los 18 aislados restantes se detectaron mutaciones en ambos genes.

La mayor parte de los aislados (15 de 21, 71,4%) presentaron una mutación simple en el gen *gyrA* y otra en el *parC*. En todos estos aislados, el cambio en los aminoácidos de la región QRDR observado en la proteína GyrA fue Ser-83 →Val y la modificación en la proteína ParC fue Ser-80→Arg (tabla 14).

En 4 aislados se detectaron los cambios Ser-83→Leu y Asp-87→Asn conjuntamente en la proteína GyrA (tabla 14). En 2 de estos 4 aislados, estas modificaciones se acompañaron de los cambios Ala-56→Thr y Ser-80→Ile en la proteína ParC. En otro de estos 4 aislados, los cambios en GyrA se acompañaron de una sola mutación en el gen *parC* (Ser-80→Ile), mientras que en el aislado restante no se detectó ninguna mutación en el gen *parC*.

Las mutaciones que con mayor frecuencia se detectan en la proteína GyrA de *E.coli* afectan a los codones Ser-83 y Asp-87 y la sustitución más frecuente en el codón 87 es Asp-87→Asn (Everett *et al.*, 1996; Saenz *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005), lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, en el codón 83 la sustitución observada con mayor frecuencia suele ser Ser-83→Leu (Everett *et al.*, 1996; Sáenz *et al.*, 2003; Yang *et al.*,

Tabla 14. Cambios en los aminoácidos de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de las proteínas GyrA y ParC de los aislados altamente resistentes y resistentes procedentes de las tres etapas del ensayo.

Cambio en los aminoácidos de la QRDR de GyrA/ParC	Etapas de ensayo			
	AT*	FT	PT	Total
	% (n=18)	% (n=0)	% (n=3)	(n=21)
Sin mutaciones	0	0	66,7 (2)	9,5 (2)
Ser-83 → Val / Ser-80 → Arg	83,3 (15)	0	0	71,4 (15)
Ser-83 → Leu + Asp-87 → Asn / Sin mutación	0	0	33,3 (1)	4,8 (1)
Ser-83 → Leu + Asp-87 → Asn / Ala-56 → Thr + Ser-80 → Ile	11,1 (2)	0	0	9,5 (2)
Ser-83 → Leu + Asp-87 → Asn / Ser-80 → Ile	5,6 (1)	0	0	4,8 (1)

*AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

2004; Lee *et al.*, 2005) y, aunque en nuestro estudio también se detectó esta mutación en 4 aislados, la mutación más frecuente en este codón fue Ser-83→Val. Que tengamos conocimiento, esta modificación sólo se ha descrito con anterioridad en una cepa de *E. coli* de origen humano (Sáenz *et al.*, 2003). Por tanto, esta sería la primera vez que se describe esta mutación espontánea en aislados de *E. coli* de origen porcino.

Según estudios previos, las mutaciones dobles más frecuentes en GyrA suelen ser Ser-83→Leu y Asp-87→Asn (Everett, *et al.*, 1996; Sáenz *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). Sin embargo, y a pesar de que en nuestro estudio también se han detectado estas mutaciones dobles, la frecuencia de aparición de las mismas es inferior a la que se describe en dichos estudios.

En cuanto a los cambios en la región QRDR de la proteína ParC, las modificaciones suelen producirse en el codón 80, análogo del codón 83 de la proteína GyrA (Everett *et al.*, 1996; Sáenz *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005), lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, según estos autores, el cambio más frecuente es Ser-80→Ile, mientras que en nuestro estudio, pese a detectar también esta mutación en un total de tres aislados (14,2%), el cambio detectado con mayor frecuencia fue Ser-80→Arg, ya que 15 de los 21 aislados de *E. coli* analizados (71,4%) presentaban este cambio de aminoácido en la proteína ParC.

En 2 de los aislados analizados se detectó una sustitución fuera de la región QRDR de la proteína ParC (Ala-56→Thr) y en ambos casos esta modificación se presentó de forma simultánea con la sustitución Ser-80→Ile. En la bibliografía consultada, sólo hemos encontrado un estudio realizado por Sáenz *et al.* (2003) con aislados de *E. coli* procedentes de productos alimenticios, seres humanos y animales sanos en el que se describe esta modificación, que en este caso fue detectada únicamente en un aislado de *E. coli* resistente al ácido nalidíxico y de origen porcino.

En todos los aislados resistentes, sólo detectamos mutaciones simples en *gyrA* y *parC*, que fueron Ser-83→Val en la proteína GyrA y Ser-80→Arg en ParC. Sin embargo, dentro de los aislados altamente resistentes, encontramos tanto mutaciones simples como dobles en los genes *gyrA* y *parC*. En otros estudios se ha correlacionado la presencia de un mayor número de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* con mayores niveles de resistencia a quinolonas (Heisig, 1996; Vila *et al.*, 1996; Saenz *et al.*, 2003; Cavaco *et al.*, 2008). Sin embargo, nosotros hemos detectado aislados altamente resistentes con mutaciones simples en la proteína GyrA y en ParC o dobles mutaciones en GyrA y una mutación simple en ParC. Incluso dos de los aislados altamente resistentes no presentaron ninguna mutación y en otro aislado sólo se detectó una mutación simple en la proteína GyrA. Por este motivo, nuestros resultados no permiten afirmar que la presencia de mutaciones dobles de lugar a un mayor nivel de resistencia a quinolonas y es posible que en estos aislados altamente resistentes, las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* estén asociadas a otros mecanismos de resistencia a quinolonas detectados en *E. coli* (no incluidos en el presente estudio) como son la expresión de bombas de flujo o la protección de la diana de acción de las quinolonas a través de los genes *qnr* de localización plasmídica (Everett *et al.*, 1996; Saenz *et al.*, 2004; Hopkins *et al.*, 2005; Robicsek *et al.*, 2006b).

4.3. FENOTIPOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.

4.3.1 Fenotipos de resistencia antimicrobiana en el total de los aislados de *E. coli*.

Se detectaron un total de 22 fenotipos de resistencia diferentes en este estudio. En la etapa inicial se identificaron 16 de estos resistotipos. En la etapa fin de tratamiento la diversidad de los fenotipos de resistencia se redujo considerablemente, agrupándose los 110 aislados de esta fase en 9 fenotipos de resistencia y en la fase post-tratamiento se detectaron un total de 11 resistotipos entre los 70 aislados de *E. coli* de esta etapa. Los principales fenotipos de resistencia detectados y el número de aislados de *E. coli* que presentaron estos fenotipos en cada una de las tres etapas en que se dividió el ensayo se muestran en la tabla 15. En el

Tabla 15. Fenotipos de resistencia detectados en el total de los aislados de *E. coli* en las tres etapas del ensayo.

Fenotipo de resistencia*	Nº de aislados por etapa			
	AT*	FT	PT	Total
	(n = 120)	(n = 110)	(n = 70)	(n = 300)
Sin resistencias	6	10	1	17
Amx^r *	1	0	10	11
Dox^r	7	1	16	24
Dox^r Amx^r	43	0	26	8
Dox^r Gen^r	0	0	8	69
Amx^r Gen^r	2	0	0	2
Dox^r Amx^r Gen^r	42	98	6	146
Dox^r Amx^r Enr^r	18	0	0	18
Dox^r Amx^r Gen^r Enr^r	0	0	3	3
Dox^r Amx^r Gen^r Col^r	1	1	0	2

* Amx^r, resistente a amoxicilina; Dox^r, resistente a doxiciclina; Gen^r, resistente a gentamicina; Enr^r, resistente a enrofloxacin; Col^r, resistente a colistina; AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

fenotipo “sin resistencias” se han agrupado todos los aislados en los que no se detectó resistencia a ninguno de los antibióticos estudiados y los aislados con sensibilidad intermedia.

Antes de iniciar el tratamiento con colistina predominaban dos resistotipos: Dox^r-Amx^r (resistencia a doxiciclina y amoxicilina) y Dox^r-Amx^r-Gen^r (resistencia a doxiciclina, amoxicilina y gentamicina). Este último fenotipo (Dox^r-Amx^r-Gen^r) fue el absoluto predominante en la etapa fin de tratamiento, ya que 98 de los 110 aislados de esta etapa presentaron este fenotipo de resistencia (tabla 15). En la etapa post-tratamiento volvió a predominar, aunque en menor medida, uno de los fenotipos mayoritarios que se detectaron antes del tratamiento con la colistina, el resistotipo Dox^r-Amx^r (tabla 15).

En este estudio sólo se detectaron dos aislados de *E. coli* resistentes al antibiótico administrado por vía oral. Uno de ellos se aisló de uno de los cerdos del grupo tratado con 5 mg/kg/día de colistina antes de iniciar el tratamiento y el otro de un animal del grupo tratado con 15 mg/kg/día después de haber finalizado la administración del antimicrobiano (tabla 15). Estos dos aislados eran multiresistentes, ya que, además de ser resistentes a la colistina, también lo eran a la doxiciclina, la amoxicilina y la gentamicina (tabla 15). Por lo dicho, este resistotipo estaba presente en el tracto gastrointestinal de al menos uno de los animales del grupo tratado con 5 mg/Kg/día antes de iniciarse el tratamiento. En principio, por lo tanto, cabía esperar que este fenotipo de resistencia hubiera persistido ventajosamente frente a otras poblaciones de *E. coli* por efecto del tratamiento. Sin embargo, este hecho no se observó, ya que el resistotipo aludido no se detectó en la fase final del tratamiento. Una explicación que no puede descartarse es que no haya una perfecta correspondencia entre la resistencia a la colistina detectada *in vitro* y lo que acontece realmente *in vivo*.

El fenotipo detectado con mayor frecuencia en nuestro estudio (Dox^r-Amx^r-Gen^r) ya estaba presente en el tracto gastrointestinal de los animales antes de iniciar la administración de colistina. El hecho de que en la fase fin de tratamiento este fenotipo lo presentasen el 89 % de los aislados parece indicar que, de alguna manera, se produjo una selección y posible expansión clonal de los aislados que presentaban este fenotipo antes del tratamiento con colistina, más aún cuando el otro fenotipo mayoritario en la etapa inicial no se detectó en esta fase. Parece claro que la predominancia del fenotipo de resistencia Dox^r-Amx^r-Gen^r al final del tratamiento está relacionada específicamente con la resistencia a gentamicina puesto que el

resistotipo Dox^r-Amx^r (sin resistencia a gentamicina) presente también mayoritariamente antes de iniciar el tratamiento desaparece por completo al finalizar este. En el apartado 4.2.4D se discutió la posible interacción entre las resistencias a colistina y gentamicina. Abundando en ello, y con los resultados expuestos en este apartado, cabe pensar que los *E. coli* resistentes a gentamicina tienen ventaja para persistir en presencia de colistina posiblemente debido a que *in vivo* las alteraciones en la membrana que suponen la resistencia a gentamicina afectan de algún modo al sitio de acción en la membrana de la colistina.

Como se detalla en los apartados siguientes y en las tablas 16 a 18, en los tres grupos de tratamiento se encontraron las mismas tendencias descritas para el conjunto de los aislados en cuanto a los resistotipos presentes, su frecuencia y su oscilación.

4.3.2. Fenotipos de resistencia antimicrobiana de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.

Las frecuencias de detección de los fenotipos de resistencia observados en los aislados de *E. coli* procedentes del grupo de animales que recibieron una dosis de 5 mg/kg/día de colistina se muestran en la tabla 16.

En este grupo de tratamiento se detectaron un total de 7 fenotipos de resistencia. Todos estos fenotipos estaban presentes antes de iniciar la administración por vía oral de colistina. Sin embargo, la variedad fenotípica disminuyó considerablemente después del tratamiento con colistina, agrupándose los 30 aislados de esta etapa en sólo 2 fenotipos. En la etapa post-tratamiento, la diversidad fenotípica fue similar a la observada en la fase fin de tratamiento, detectándose un total de 3 fenotipos diferentes.

Tabla 16. Fenotipos de resistencia detectados en los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina a lo largo de las tres etapas del ensayo.

Fenotipo de resistencia*	Nº de aislados por etapa			
	AT	FT	PT	Total
	(n = 40)	(n = 30)	(n = 30)	(n = 100)
Sin resistencias	3	0	1	4
Amx ^r	0	0	0	0
Dox ^r	6	1	9	16
Dox ^r Amx ^r	13	0	19	32
Dox ^r Gen ^r	0	0	0	0
Amx ^r Gen ^r	1	0	0	1
Dox ^r Amx ^r Gen ^r	14	29	1	44
Dox ^r Amx ^r Enr ^r	2	0	0	2
Dox ^r Amx ^r Gen ^r Enr ^r	0	0	0	0
Dox ^r Amx ^r Gen ^r Col ^r	1	0	0	1

* Amx^r, resistente a amoxicilina; Dox^r, resistente a doxiciclina; Gen^r, resistente a gentamicina; Enr^r, resistente a enrofloxacina; Col^r, resistente a colistina; AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

4.3.3. Fenotipos de resistencia antimicrobiana de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina.

Como se muestra en la tabla 17, dentro de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina se detectaron un total de 4 fenotipos de resistencia diferentes. Antes de iniciar el tratamiento con colistina sólo se detectaron 3 de estos fenotipos, siendo los resistotipos predominantes Dox^r Amx^r y Dox^r Amx^r Gen^r. Después del tratamiento, todos los aislados presentaron un mismo fenotipo de resistencia (Dox^r Amx^r Gen^r) y en la etapa post-tratamiento fueron 2 los fenotipos detectados (Dox^r y Dox^r Amx^r Gen^r), si bien hay que recordar que en esta etapa únicamente se obtuvieron aislados de uno de los cuatro cerdos.

Dentro de este grupo de tratamiento no hubo aislado alguno que fuera sensible a todos los antibióticos incluidos en el estudio y tampoco se detectó ningún aislado que fuera resistente a colistina (tabla 17).

4.3.4. Fenotipos de resistencia antimicrobiana de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina.

Dentro de este grupo de tratamiento se detectaron un total de 10 fenotipos de resistencia diferentes (tabla 18), siendo el grupo en el que mayor diversidad de perfiles fenotípicos se detectaron.

En la etapa inicial se detectaron 7 de los 10 fenotipos observados en este grupo. La variabilidad fenotípica se redujo tras el tratamiento con colistina, fase en la que sólo se detectaron 3

Tabla 17. Fenotipos de resistencia detectados en los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina a lo largo de las tres etapas del ensayo.

Fenotipo de resistencia*	Nº de aislados por etapa			
	AT	FT	PT	Total
	(n = 40)	(n = 40)	(n = 10)	(n = 90)
Sin resistencias	0	0	0	0
Amx ^r	0	0	0	0
Dox ^r	0	0	5	5
Dox ^r Amx ^r	20	0	0	20
Dox ^r Gen ^r	0	0	0	0
Amx ^r Gen ^r	0	0	0	0
Dox ^r Amx ^r Gen ^r	19	40	5	64
Dox ^r Amx ^r Enr ^r	1	0	0	1
Dox ^r Amx ^r Gen ^r Enr ^r	0	0	0	0
Dox ^r Amx ^r Gen ^r Col ^r	0	0	0	0

* Amx^r, resistente a amoxicilina; Dox^r, resistente a doxiciclina; Gen^r, resistente a gentamicina; Enr^r, resistente a enrofloxacin; Col^r, resistente a colistina; AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

Tabla 18. Fenotipos de resistencia detectados en los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina a lo largo de las tres etapas del ensayo.

Fenotipo de resistencia*	Nº de aislados por etapa			
	AT	FT	PT	Total
	(n = 40)	(n = 40)	(n = 30)	(n = 110)
Sin resistencias	3	10	0	13
Amx ^r	1	0	10	11
Dox ^r	1	0	2	3
Dox ^r Amx ^r	10	0	7	17
Dox ^r Gen ^r	0	0	8	8
Amx ^r Gen ^r	1	0	0	1
Dox ^r Amx ^r Gen ^r	9	29	0	38
Dox ^r Amx ^r Enr ^r	15	0	0	15
Dox ^r Amx ^r Gen ^r Enr ^r	0	0	3	3
Dox ^r Amx ^r Gen ^r Col ^r	0	1	0	1

* Amx^r, resistente a amoxicilina; Dox^r, resistente a doxiciclina; Gen^r, resistente a gentamicina; Enr^r, resistente a enrofloxacin; Col^r, resistente a colistina; AT: antes del tratamiento con colistina; FT: después del tratamiento; PT: un mes después del tratamiento.

fenotipos de resistencia (tabla 18). En la etapa post-tratamiento la diversidad de fenotipos volvió a aumentar, siendo 5 los fenotipos detectados en esta fase (tabla 18).

En este grupo, el fenotipo de resistencia Dox^r-Amx^r-Enr^r fue el detectado con mayor frecuencia antes de la administración del antibiótico. Sin embargo, en la etapa fin de tratamiento no se detectó este fenotipo de resistencia, siendo, como en todos los casos, el fenotipo más frecuente el Dox^r-Amx^r-Gen^r (tabla 18).

En resumen, los resultados obtenidos muestran que el fenotipo absolutamente predominante tras la administración de colistina fue el de Dox^r-Amx^r-Gen^r, independientemente de la dosis administrada. Este fenotipo ya estaba presente en el tracto gastrointestinal de los animales de los tres grupos experimentales antes de iniciar el tratamiento, detectándose en esta etapa con frecuencias elevadas. Como se indicó anteriormente, este hecho parece indicar que la administración de colistina por vía oral favoreció, de alguna manera, la selección de aislados con este fenotipo de resistencia y que su predominio parece estar determinado específicamente por la resistencia a gentamicina, posiblemente por su acción sobre la membrana externa de la bacteria. En el apartado 4.4 se analizan los perfiles genotípicos y su relación con los fenotipos detectados y se abunda en la discusión sobre la selección de los aislados de *E. coli* Dox^r-Amx^r-Gen^r tras la administración de colistina.

4.4. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LOS PERFILES GENOTÍPICOS Y ANÁLISIS DE LA RELACIÓN CLONAL EXISTENTE ENTRE LOS AISLADOS DE *E. coli*.

Los perfiles genotípicos de los aislados de *E. coli* se determinaron mediante la técnica de REP-PCR o PCR de secuencias palindrómicas repetitivas. El grado de similitud de los perfiles obtenidos se determinó con el programa GelCompar® II utilizando el coeficiente de correlación de Dice y UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y estableciendo un índice de tolerancia y de optimización del 1%. Se consideraron miembros de un mismo clon

aquellos aislados cuyos perfiles genotípicos compartieran una similitud igual o superior al 95 %.

4.4.1. Análisis de los perfiles genotípicos y su asociación con los fenotipos de resistencia de los aislados de *E. coli* procedentes de cada una de las etapas.

Tal y como se observa en la figura 2, los 120 aislados obtenidos antes de iniciar el tratamiento con colistina se agruparon en 45 genotipos o grupos clonales diferentes, 26 de los cuales incluían 2 o más aislados. En 13 de estos 26 grupos clonales se incluían aislados procedentes de diferentes animales y en 7 de estos 13 clones, además, se agrupaban aislados de diferente grupo de tratamiento (figura 2). Pese a compartir el mismo genotipo, los aislados de un mismo clon no solían compartir el mismo resistotipo, ya que sólo en 4 de los 26 clones se encontró que el genotipo estuviera asociado con un único fenotipo de resistencia (figura 2).

Como puede observarse en la figura 3, en los 110 aislados de *E. coli* obtenidos en la etapa fin de tratamiento se detectaron un total de 24 genotipos distintos, 18 de los cuales contenían al menos dos aislados. La mayoría de los grupos clonales encontrados en esta fase incluían aislados procedentes de diferentes animales y de distinto grupo de tratamiento ya que sólo 3 de los clones estaban formados íntegramente por aislados de un mismo animal (figura 3). Tal y como queda reflejado en la figura 3, los diferentes genotipos detectados en esta etapa se asociaron con un sólo resistotipo mayoritario, el Dox^r-Amx^r-Gen^r.

En la etapa post-tratamiento se detectaron 28 genotipos entre los 70 aislados de *E. coli* obtenidos en esta fase (figura 4). En este caso, sólo se detectaron 10 grupos clonales que incluyeran al menos 2 aislados de *E. coli*, es decir, que 18 de los genotipos se correspondían con un único aislado y de esos 10 grupos clonales, 7 estaban formados por aislados procedentes de un mismo animal (figura 4). Tal y como se observa en la figura 4, la variabilidad

Figura 2. Similitud genética y fenotipos de resistencia de los aislados de *E. coli* obtenidos antes de iniciar el tratamiento con colistina.

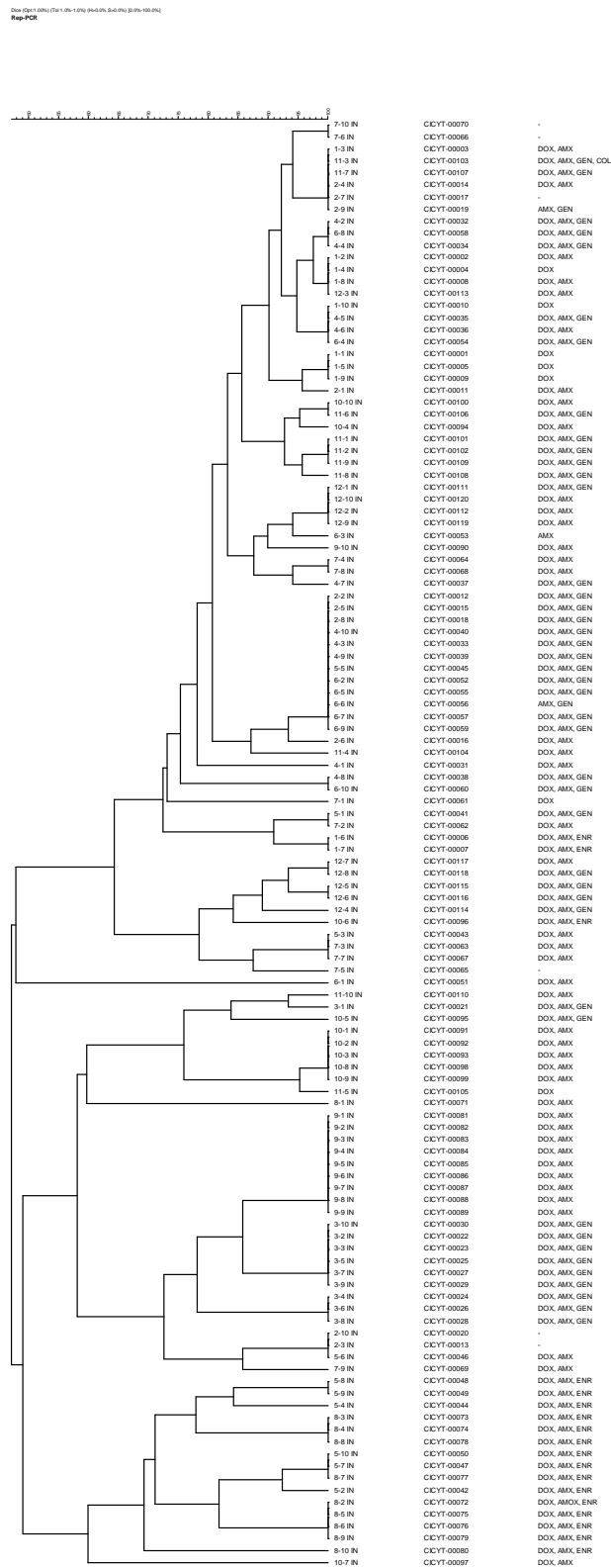


Figura 3. Similitud genética y fenotipos de resistencia de los aislados de *E. coli* obtenidos al finalizar el tratamiento con colistina.

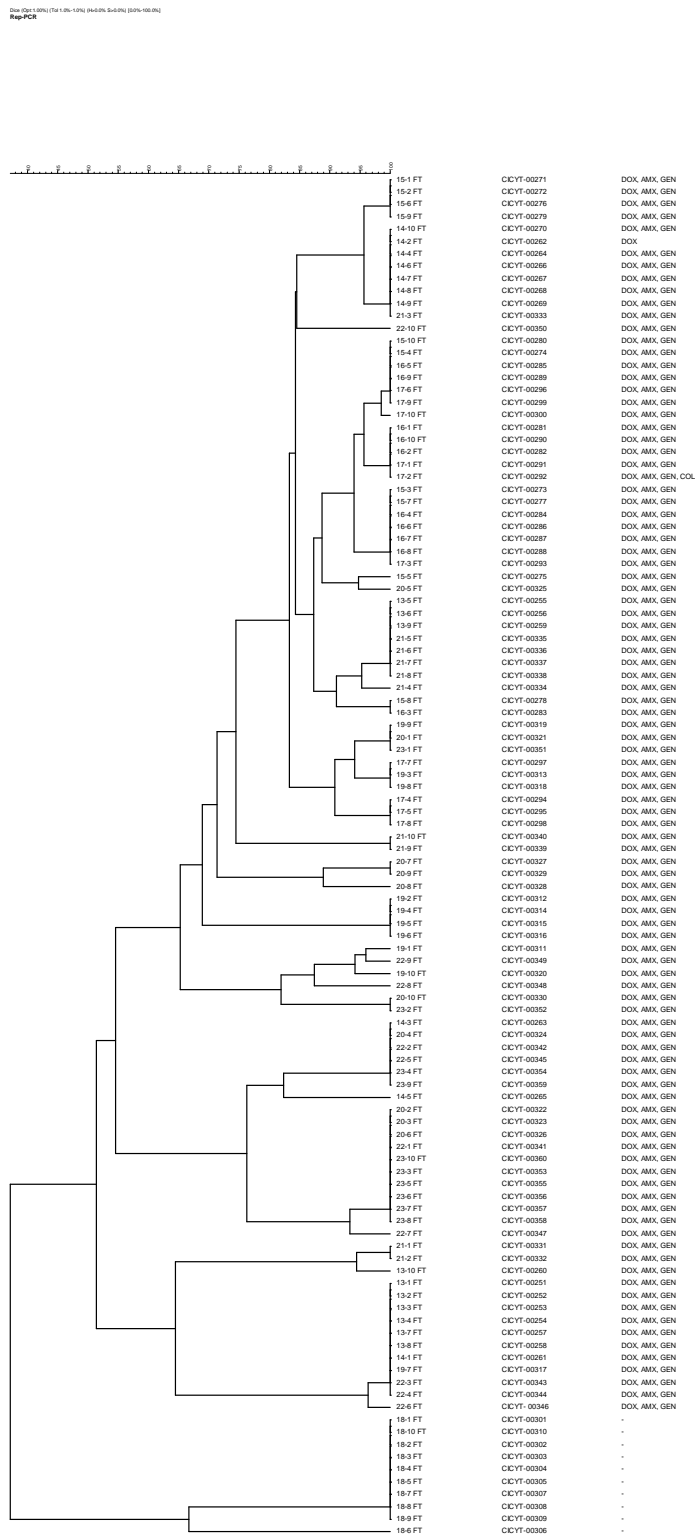
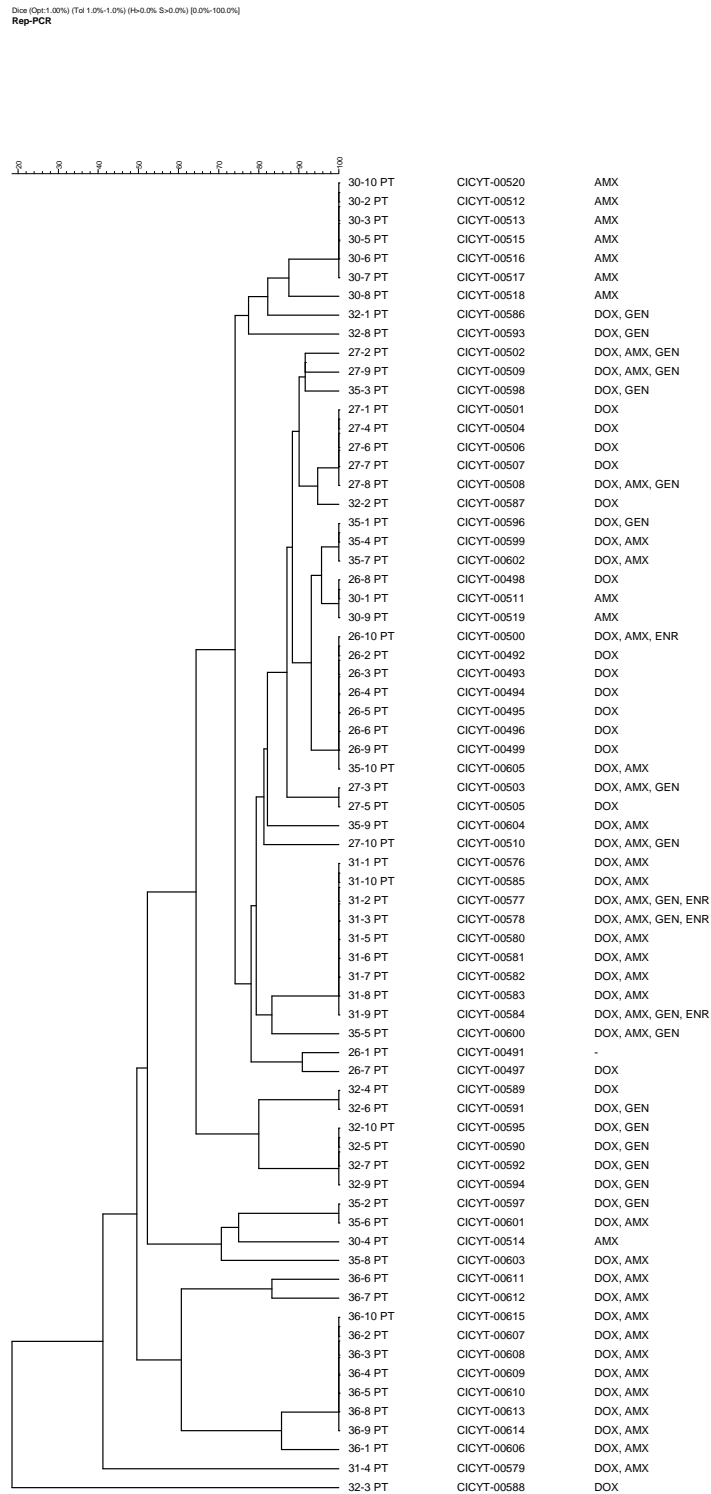


Figura 4. Similitud genética y fenotipos de resistencia de los aislados de *E. coli* obtenidos cuatro semanas después de finalizar el tratamiento con colistina.



genotípica encontrada en los aislados de esta etapa también se acompañó de una gran variabilidad de fenotipos de resistencia y, así, 7 de los grupos clonales se asociaron con más de un resistotipo (incluso en un grupo clonal formado por 6 aislados se detectaron 4 resistotipos distintos) y sólo en los 3 grupos clonales restantes todos los aislados de *E. coli* presentaron el mismo fenotipo de resistencia.

Los resultados expuestos muestran que la variabilidad genotípica y de fenotipos de resistencia encontrada en los aislados de *E. coli* obtenidos antes de iniciarse el tratamiento se redujo considerablemente después de tratar a los animales durante cinco días con distintas dosis de colistina, pasándose de 45 genotipos detectados en la fase inicial a los 24 encontrados tras el tratamiento. Por otra parte, en la etapa fin de tratamiento, como ya se ha expuesto reiteradamente en apartados anteriores, se encontró un fenotipo de resistencia mayoritario, el Dox^r-Amx^r-Gen^r. Por lo tanto, parece claro que el tratamiento con colistina indujo, de alguna manera, la selección de determinados genotipos asociados con el fenotipo de resistencia Dox^r-Amx^r-Gen^r. Es posible que a esta selección contribuyera la transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias o la captación de estos genes de resistencia del medio intestinal por parte de los aislados de *E. coli*, lo que explicaría la asociación de diferentes genotipos a un mismo fenotipo de resistencia. De hecho, el análisis de los perfiles genotípicos y de los resistotipos de los aislados obtenidos en la etapa post-tratamiento corrobora la idea de que la administración de colistina influyó de algún modo en la variabilidad genotípica de los aislados, ya que en esta fase, de nuevo sin la influencia del tratamiento antibiótico, volvió a incrementarse la variabilidad de genotipos, predominando los grupos clonales formados por un escaso número de aislados y encontrándose 18 perfiles genotípicos representados por un solo aislado.

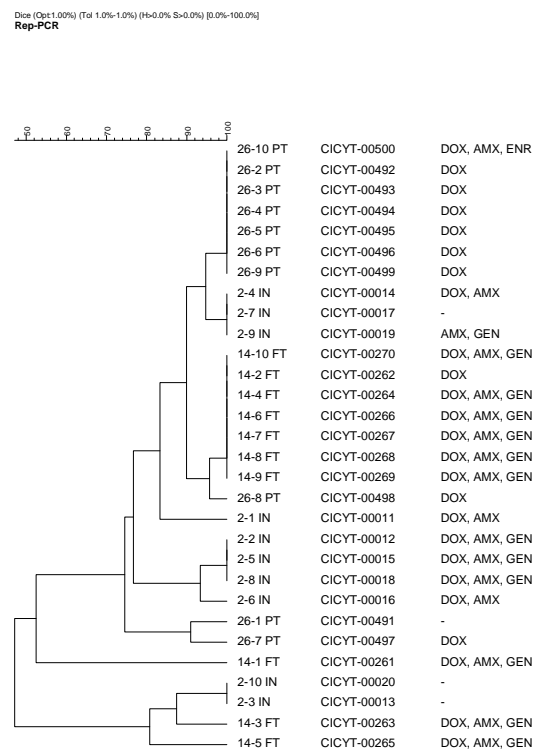
4.4.2. Análisis de los perfiles genotípicos y su asociación con los fenotipos de resistencia de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales incluidos en los diferentes grupos de tratamiento.

4.4.2A. Análisis de los perfiles genotípicos y su asociación con los fenotipos de resistencia de los aislados procedentes de los animales tratados con 5 mg/kg/día de colistina.

Dentro de este grupo de tratamiento se incluyeron los animales designados con los números 1, 2, 11 y 12. De los animales 1 y 12 sólo se obtuvieron aislados de *E. coli* en dos de las etapas: la inicial y la final en el caso del animal 1, y la inicial y la post-tratamiento en el 12. En los aislados procedentes de estos dos animales se detectaron en ambos casos 7 genotipos diferentes, mientras que en los aislados de los otros dos animales de este grupo se encontraron 11 (animal 2) y 16 (animal 11) grupos clonales distintos.

En términos generales, dentro de este grupo de tratamiento se encontraron clones formados por aislados de *E. coli* procedentes de la misma etapa. Este resultado podría indicar que entre las diferentes etapas en que se dividió el ensayo experimental existió un cambio en las poblaciones de *E. coli* predominantes en el medio intestinal de los lechones tratados con esta dosis de colistina. Sin embargo, tal y como podemos observar en la figura 5, esta tendencia no se observa en los aislados procedentes de uno de los cuatro animales incluidos en este grupo de tratamiento (animal 2), entre los que sí se encontraron relaciones genotípicas entre aislados de diferentes etapas. Así, un aislado de la etapa post-tratamiento compartía el genotipo con otros 7 aislados de la etapa fin de tratamiento y 3 de los aislados de la etapa inicial pertenecían al mismo clon que otros 7 aislados de la etapa post-tratamiento. El hecho de que en este animal se encontrarán aislados en la etapa post-tratamiento con el mismo genotipo que aislados procedentes de la etapa inicial podría indicar que, al igual que en el resto de animales incluidos en este grupo de tratamiento, en el animal 2 también hubo un cambio en las poblaciones predominantes de *E. coli* entre la etapa inicial y el final del

Figura 5. Similitud genética y fenotipos de resistencia de los aislados de *E. coli* procedentes del animal 2 (grupo de tratamiento de 5 mg/kg/día de colistina).



tratamiento con colistina, y es posible que alguno de los genotipos detectados inicialmente permaneciera de forma minoritaria en el medio intestinal durante el tratamiento con colistina y que, una vez finalizado este, volvieran a expandirse.

En cuanto a la relación entre los genotipos detectados y los fenotipos de resistencia, se observa que en cada clon predomina un resistotipo, si bien ese mismo fenotipo de resistencia podía estar asociado con diferentes genotipos presentes entre los aislados del mismo animal, y, como se indicó anteriormente, esto podría deberse a la transferencia horizontal entre

bacterias de genes de resistencia o a la captación del medio intestinal de genes de resistencia por parte de los aislados de *E. coli*.

Entre los aislados de *E. coli* procedentes de la etapa inicial del animal 11 se detectó un aislado resistente a colistina. Este aislado formaba un clon junto con otros dos aislados que no compartían el fenotipo de resistencia a colistina, si bien los tres aislados de este genotipo fueron resistentes a doxiciclina, amoxicilina y gentamicina. Como se indicó anteriormente y en contra de lo que en principio cabría esperar, el tratamiento con 5 mg/kg/día de colistina aparentemente no dio lugar a la selección y expansión de los *E. coli* resistentes a este antibiótico detectados en la etapa inicial ya que al final del tratamiento no se encontraron aislados resistentes a esta polimixina.

4.4.2B. Análisis de los perfiles genotípicos y su asociación con los fenotipos de resistencia de los aislados procedentes de los animales tratados con 10 mg/kg/día de colistina.

Dentro de este grupo de tratamiento se incluyeron los animales designados con los números: 3, 4, 9 y 10. Sólo del animal número 3 se obtuvieron aislados de *E. coli* en las tres etapas en que se dividió el ensayo y entre los aislados de este animal se detectaron un total de 9 genotipos diferentes. De los otros 3 animales de este grupo, números 4, 9 y 6, sólo se obtuvieron aislados en las etapas inicial y fin de tratamiento, y entre sus aislados se detectaron respectivamente 7, 6 y 10 genotipos diferentes.

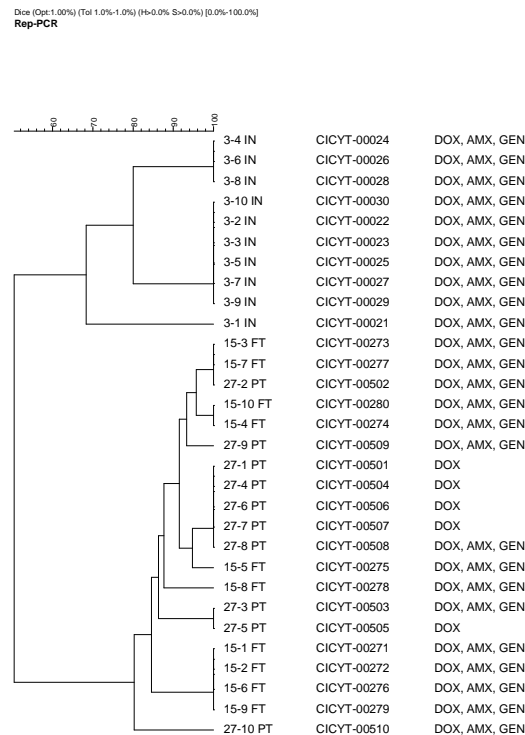
En ninguno de los cuatro animales que recibieron esta dosis de colistina se observaron clones en los que estuvieran incluidos aislados de *E. coli* de las etapas inicial y fin de tratamiento. Esto indica que, al igual que en el grupo de tratamiento de 5 mg/kg/día, se produjo un cambio en las poblaciones de *E. coli* predominantes entre el inicio del ensayo y el final del tratamiento con colistina. En los aislados procedentes del animal número 3 (único animal en el que se

puede valorar la etapa post-tratamiento) se observaron ciertas relaciones genotípicas entre aislados de las etapas fin de tratamiento y post-tratamiento (figura 6). Así, tal y como se observa en la figura 6, en uno de los clones mayoritarios formados por aislados de la etapa fin de tratamiento también se incluía un aislado de la fase post-tratamiento y, de igual manera, el clon con mayor número de aislados (5) de la etapa post-tratamiento incluía también un aislado de la etapa fin de tratamiento. Además de estas relaciones genotípicas, también se encontraron similitudes en cuanto a los fenotipos de resistencia de los aislados, ya que todos los aislados del clon formado por 4 aislados de la etapa fin de tratamiento y un aislado de la etapa post-tratamiento compartían el mismo resistotipo ($\text{Dox}^r\text{-Amx}^r\text{-Gen}^r$) (figura 6). Uno de los aislados de *E. coli* de la etapa fin de tratamiento incluido en este clon presentaba sensibilidad intermedia a colistina, característica fenotípica que no aparece ni en el resto de los aislados del mismo clon y de la misma etapa ni en el aislado de la etapa post-tratamiento (figura 6). Asimismo, como puede verse en la figura 6, en otro de los clones formado por cinco aislados de la etapa post-tratamiento y un aislado de la etapa fin de tratamiento se encontró que este último mostraba también una sensibilidad intermedia a colistina, sin que esta característica fenotípica se diera en el resto de los aislados del clon.

4.4.2C. Análisis de los perfiles genotípicos y su asociación con los fenotipos de resistencia de los aislados procedentes de los animales tratados con 15 mg/kg/día de colistina.

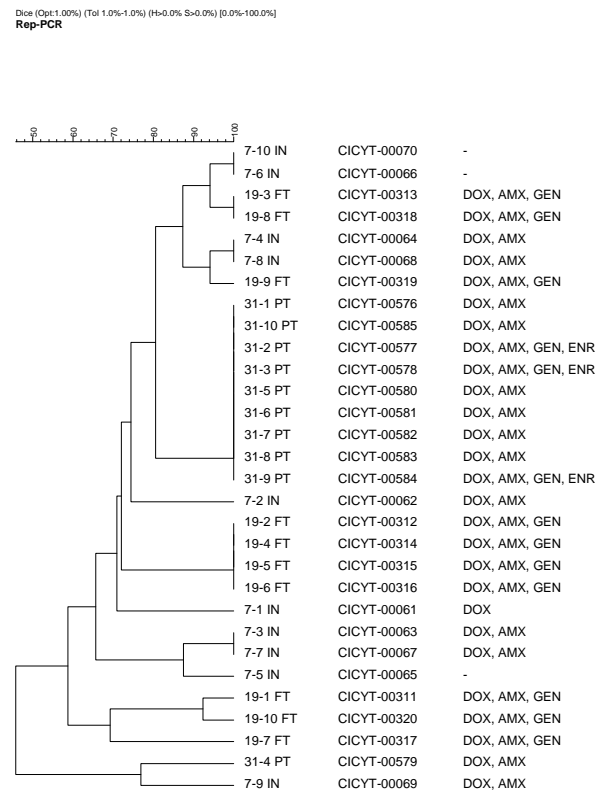
Los animales que recibieron esta dosis de colistina fueron los números 5, 6, 7 y 8. Excepto en el caso del animal 5, del que sólo se consiguieron aislados de las etapas inicial y fin de tratamiento, del resto de los animales se obtuvieron aislados de *E. coli* en todas las etapas. El número de genotipos diferentes detectados en los aislados de los animales de este grupo de tratamiento fue bastante variable. Así, los aislados del animal 5, que como se ha dicho procedían sólo de dos de las fases, se agruparon en 10 genotipos, los aislados de *E. coli* de los animales 6 y 7 se repartieron en 9 y 12 genotipos respectivamente y fueron los aislados procedentes del animal 8 los que presentaron una mayor variabilidad genotípica, detectándose 17 genotipos diferentes entre ellos.

Figura 6. Similitud genética y fenotipos de resistencia de los aislados de *E. coli* procedentes del animal 3 (grupo de tratamiento de 10 mg/kg/día de colistina).



Coincidiendo con la tendencia observada en los otros grupos de tratamiento, los aislados de la etapa inicial y de la etapa fin de tratamiento de un mismo animal se agruparon en clones diferentes, lo que, como ya se ha mencionado anteriormente, sugiere un cambio en las poblaciones predominantes de *E. coli* en la microbiota intestinal entre estas dos etapas. Esta tendencia, sin embargo, difiere con el comportamiento observado en los aislados del animal número 7, ya que dos de los clones en los que se agruparon sus aislados estaban formados tanto por aislados de la etapa inicial como de la etapa fin de tratamiento (Figura 7). Además, tal y como se observa en la figura 7, entre los aislados de la etapa inicial y fin de tratamiento de estos dos clones se encontraron diferencias en el fenotipo de resistencia, especialmente en

Figura 7. Similitud genética y fenotipos de resistencia de los aislados de *E. coli* procedentes del animal 7 (grupo de tratamiento de 15 mg/kg/día de colistina).



uno de estos clones, en el que los aislados de la etapa inicial fueron sensibles a todos los antibióticos analizados mientras que los procedentes de la etapa fin de tratamiento presentaron el fenotipo de resistencia $\text{Dox}^r\text{-Amx}^r\text{-Gen}^r$. La asociación de un mismo genotipo con fenotipos de resistencia tan diferentes podría indicarnos que los aislados de *E. coli* detectados inicialmente en este animal podrían haberse mantenido durante el tratamiento antibiótico y habrían dado lugar a los aislados con el fenotipo de resistencia $\text{Dox}^r\text{-Amx}^r\text{-Gen}^r$ encontrados en la etapa fin de tratamiento bien por captación de genes de resistencia

presentes en el medio intestinal o bien por adquisición de esos genes a través de fenómenos de transferencia horizontal.

En el animal 6 también se detectaron similitudes genotípicas entre los aislados de la etapa inicial y post-tratamiento, puesto que dos de los clones en los que se agruparon los aislados de *E. coli* de este animal contenían aislados de ambas etapas. Sin embargo, y pese a compartir el mismo genotipo, los fenotipos de resistencia de los aislados de una y otra etapa fueron diferentes, siendo susceptibles a un mayor número de antibióticos los aislados de la etapa post-tratamiento.

En este grupo de tratamiento se detectó un aislado de *E. coli* resistente a colistina procedente del animal 5 y de la etapa fin de tratamiento. Este aislado formaba parte del clon mayoritario de la etapa fin de tratamiento (formado por 5 de los 10 aislados de esta etapa). Todos los aislados de este clon presentaban el fenotipo de resistencia $\text{Dox}^r\text{-Amx}^r\text{-Gen}^r$. Sin embargo, ningún otro aislado fue resistente a colistina.

En resumen, podemos decir que los resultados del análisis de los perfiles genotípicos y su asociación con fenotipos de resistencia de los aislados de *E. coli* examinados en este estudio parecen indicar que el tratamiento con colistina por vía oral en cerdos no desencadenó una selección de aislados resistentes a colistina ni aumentó el nivel de resistencia a este antibiótico de forma significativa y que este fenómeno se observó independientemente de la dosis de colistina administrada. Es posible que este fenómeno se deba al poder bactericida que posee la colistina sobre los gram-negativos y que hace que en la mayoría de los casos los aislados de *E. coli* sean susceptibles a este antibiótico (Landman *et al.*, 2008), además de a la escasa prevalencia de resistencias adquiridas frente a colistina descritas en *E. coli* (Boyen *et al.*, 2010) y al hecho de que la aparición de resistencias a este antibiótico polipeptídico no radica en la adquisición o expresión de genes de resistencia, sino que se debe a un mecanismo molecular complejo que conduce a modificaciones en la membrana externa (Breazeale *et al.*, 2005; Falagas *et al.*, 2010) y que parece activarse de forma individual. Sin embargo, el tratamiento con esta polimixina sí ocasionó un cambio en las poblaciones de *E. coli* predominantes en la

microbiota intestinal, con una tendencia a favorecer el desarrollo de una población bacteriana bastante homogénea desde el punto de vista genotípico y que en su gran mayoría presentó un mismo fenotipo de resistencia, el Dox^r-Amx^r-Gen^r. En términos generales, los aislados de *E. coli* agrupados dentro de un mismo clon y que por tanto compartían un mismo genotipo, presentaron diferentes fenotipos de resistencia, especialmente en el caso de los clones de las etapas inicial y post-tratamiento, lo que indica que estas diferencias en los resistotipos podrían deberse a que algunas bacterias de estos clones hubieran perdido sus genes de resistencia o, lo que parece más probable, que parte de esas bacterias incluidas en el mismo clon hubieran adquirido genes de resistencia del medio intestinal por la transferencia horizontal de los mismos a partir de otras bacterias.

4.5 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL GEN *tet*(M) DETECTADO EN LOS AISLADOS DE *E. coli* PROCEDENTES DE CERDOS TRATADOS CON COLISTINA.

Durante el estudio de los genes de resistencia a tetraciclinas se detectó el gen *tet*(M) en un total de 13 aislados de *E. coli* procedentes de 4 animales diferentes y aislados en la etapa FT. Como se ha comentado anteriormente (apartado 4.1.2.3E., detección de genes implicados en la resistencia a tetraciclinas) la presencia de este gen de resistencia en aislados de *E. coli* no es demasiado frecuente y, sin embargo, es uno de los genes de resistencia a tetraciclinas más detectado en aislados de enterococos (Aarestrup *et al.*, 2000; Huys *et al.*, 2004; Cauwerts *et al.*, 2007; Hummel *et al.*, 2007). Por este motivo, se planteó la posibilidad de que se produjera la transferencia de este gen en el medio intestinal entre estas dos especies bacterianas integrantes de la microbiota de los cerdos. Así, con el fin de explorar esta hipótesis se realizaron los estudios que se exponen en este apartado en los que se incluyeron, además de los 13 aislados de *E. coli* en los que se detectó el gen *tet*(M) (tabla 19), 36 aislados de enterococos *tet*(M) positivos procedentes de los mismos animales en los que se habían encontrado los aislados de *E. coli* portadores del gen *tet*(M), incluyéndose 3 aislados de *Enterococcus spp.* por cada animal y momento de la toma de muestras (tabla 20).

Tabla 19. Aislados de *E. coli* incluidos en el estudio del gen *tet(M)* y detección de los transposones Tn916, Tn5397 y Tn5801.

Aislado	Animal/etapa	Sensibilidad a doxiciclina	Transposones detectados (Tn916, Tn5397, Tn5801)
CICYT-268	2-FT*	Resistente	Ninguno
CICYT-311	7-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-317	7-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-319	7-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-320	7-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-331	9-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-332	9-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-343	10-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-344	10-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-346	10-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-347	10-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-348	10-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-349	10-FT	Resistente	Ninguno

* FT: después del tratamiento

Tabla 20. Aislados de *enterococcus spp.* incluidos en el estudio del gen *tet(M)* y detección de los transposones Tn916, Tn5397 y Tn5801.

Aislado	Especie	Animal/etapa	Sensibilidad a Doxiciclina	Transposones detectados (Tn916, Tn5397, Tn5801)
CICYT-131	<i>E. faecalis</i>	2-INI	Intermedio	Tn916
CICYT-132	<i>E. faecalis</i>	2-INI	Intermedio	Tn916
CICYT-133	<i>E. faecalis</i>	2-INI	Intermedio	Tn916
CICYT-182	<i>E. faecalis</i>	7-INI	Intermedio	Ninguno
CICYT-183	<i>E. faecalis</i>	7-INI	Intermedio	Ninguno
CICYT-186	<i>E. faecalis</i>	7-INI	Intermedio	Ninguno
CICYT-202	<i>E. faecium</i>	9-INI	Sensible	Tn916
CICYT-204	<i>E. faecalis</i>	9-INI	Intermedio	Ninguno
CICYT-205	<i>E. faecium</i>	9-INI	Intermedio	Tn5397, Tn5801
CICYT-212	<i>E. faecalis</i>	10-INI	Intermedio	Ninguno
CICYT-213	<i>E. faecalis</i>	10-INI	Intermedio	Ninguno
CICYT-214	<i>E. faecalis</i>	10-INI	Intermedio	Ninguno
CICYT-381	<i>E. faecalis</i>	2-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-382	<i>E. faecalis</i>	2-FT	Intermedio	Ninguno
CICYT-383	<i>E. faecalis</i>	2-FT	Intermedio	Tn916
CICYT-436	<i>E. faecalis</i>	7-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-438	<i>E. faecalis</i>	7-FT	Resistente	Ninguno
CICYT-440	<i>E. faecalis</i>	7-FT	Intermedio	Ninguno
CICYT-451	<i>E. faecalis</i>	9-FT	Intermedio	Ninguno

Tabla 20 (continuación). Aislados de *enterococcus spp.* incluidos en el estudio del gen *tet(M)* y detección de los transposones Tn916, Tn5397 y Tn5801.

Aislado	Especie	Animal/etapa	Sensibilidad a Doxiciclina	Transposones detectados (Tn916, Tn5397, Tn5801)
CICYT-452	<i>E. hirae</i>	9-FT	Intermedio	Tn5397
CICYT-453	<i>E. faecalis</i>	9-FT	Intermedio	Ninguno
CICYT-462	<i>E. hirae</i>	10-FT	Intermedio	Ninguno
CICYT-463	<i>E. hirae</i>	10-FT	Intermedio	Ninguno
CICYT-467	<i>E. hirae</i>	10-FT	Intermedio	Ninguno
CICYT-531	<i>E. faecalis</i>	2-PT	Intermedio	Ninguno
CICYT-532	<i>E. faecalis</i>	2-PT	Intermedio	Ninguno
CICYT-533	<i>E. faecalis</i>	2-PT	Sensible	Tn916
CICYT-616	<i>E. faecium</i>	7-PT	Sensible	Tn916
CICYT-617	<i>E. faecium</i>	7-PT	Intermedio	Tn5397
CICYT-618	<i>E. faecalis</i>	7-PT	Intermedio	Ninguno
CICYT-639	<i>E. faecalis</i>	9-PT	Intermedio	Ninguno
CICYT-640	<i>E. faecalis</i>	9-PT	Intermedio	Ninguno
CICYT-641	<i>E. faecalis</i>	9-PT	Sensible	Ninguno
CICYT-651	<i>E. faecalis</i>	10-PT	Intermedio	Ninguno
CICYT-652	<i>E. faecalis</i>	10-PT	Intermedio	Ninguno
CICYT-653	<i>E. faecalis</i>	10-PT	Sensible	Ninguno

4.5.1. Detección de los transposones Tn916, Tn5397 y Tn5801.

Dado que el gen *tet*(M) suele localizarse en elementos móviles como plásmidos conjugativos y transposones, se analizó la presencia de los transposones Tn916, Tn5397 y Tn5801 en los 13 aislados de *E. coli* y en los 36 aislados de enterococos portadores del gen *tet*(M) incluidos en este estudio. Para estudiar la presencia del Tn916 se detectó el gen *xis*-Tn, gen que codifica para la enzima excisionasa del transposón. Para detectar el Tn5397 se amplificó el gen *tndX*, que codifica para la resolvasa necesaria para la transposición de este transposón. Por último, la presencia del Tn5801 se analizó a través de la detección del gen *int* del transposón, necesario para codificar la enzima integrasa.

En los aislados de *E. coli* portadores del gen *tet*(M) no se detectaron ni el gen *xis*-Tn del transposón Tn916, ni el gen *tndX* del transposón Tn5397, ni el gen *int* del transposón Tn5801 (tabla 19). En el caso de los enterococos, sólo se detectó alguno de estos tres transposones en 10 de los 36 aislados (27,8 %) (tabla 20) siendo el gen *xis*-Tn del transposón Tn916 el detectado con mayor frecuencia (tabla 20). Este índice de detección tan bajo contrasta con los resultados de otros autores como De Leener *et al.* (2004), quienes detectaron el transposón Tn916 en un número de aislados de enterococos de origen porcino y positivos al gen *tet*(M) muy superior al encontrado en este estudio. Agersø *et al.* (2006) también detectaron el transposón Tn916 en un elevado porcentaje (86%) de aislados de *E. faecium* procedentes de cerdos, aunque en el caso de los aislados de *E. faecalis* este porcentaje de detección fue bastante inferior (53 %). Sin embargo, estos autores tampoco detectaron ningún transposón en el 47 % de los aislados de *E. faecalis* de origen porcino, resultado que concuerda más con los encontrados en el presente estudio, donde no se han detectado transposones en 23 de los 28 aislados de *E. faecalis* incluidos en el análisis. Por otra parte, en el estudio realizado por Agersø *et al.* (2006) no se detectó el transposón Tn5397 en ningún enterococo de origen porcino, mientras que, en el presente estudio, el gen *tndX* de este transposón se detectó en 3 de los 36 (8,3 %) aislados analizados.

En uno de los aislados de *E. faecium* portadores del gen *tet(M)* se detectó el transposón Tn 5801 (tabla 20). Hasta el momento, el gen *tet(M)* asociado a este transposón se había identificado en *Staphylococcus aureus* Mu50 (Kuroda *et al.*, 2001) y en aislados de *S. aureus* de origen humano (de Vries *et al.*, 2009). Sin embargo, no hay datos previos en la bibliografía acerca de la detección de este transposón en aislados de enterococos y el hecho de haber detectado este elemento conjugativo en uno de nuestros aislados podría indicar una posible transferencia de este transposón entre estos dos géneros de bacterias gram-positivas.

El gen *tet(M)* suele localizarse en transposones, tales como Tn916, Tn5397 o Tn5801. La baja detección de transposones entre los aislados incluidos en este estudio nos hace pensar que el gen de resistencia a tetraciclinas *tet(M)* presente en los aislados de *E. coli* y en la mayoría de los enterococos analizados no se encuentra en ningún transposón, sino que, en este caso, podría encontrarse en plásmidos conjugativos, otra localización del gen también descrita, aunque con menor frecuencia (Chopra y Roberts, 2001).

4.5.2 Resultados del estudio de la posible transferencia por conjugación del gen *tet(M)* a través de la técnica de *filter mating*.

Tal y como se describe en el apartado 3.7.3 del capítulo de Material y Métodos, para determinar si el gen *tet(M)* podía ser transferido por conjugación se realizaron tres ensayos: uno empleando aislados de enterococos como bacterias donadoras y receptoras del gen, otro empleando aislados de *E. coli* como donadores del gen y enterococos como receptores y otro en el que los enterococos fueron los donadores del gen y los aislados de *E. coli* los receptores.

El gen *tet(M)* fue transferido con éxito entre los enterococos donadores (*E. faecalis* CICYT-381, *E. faecalis* CICYT- 436, *E. faecalis* CICYT-453 y *E. hirae* CICYT-467) y los enterococos empleados como receptores (*E. faecium* BM4105 y *E. faecalis* JH2-2), excepto en los ensayos de

conjugación llevados a cabo entre *E. hirae* CICYT-467 y *E. faecium* BM4105 y entre *E. faecalis* CICYT-381 y *E. faecalis* JH2-2, en los que se obtuvieron menos de 10^{-9} transconjugantes por donador (tabla 21). La frecuencia de transferencia del gen *tet*(M) en los ensayos realizados entre *E. faecalis* y *E. faecium* BM4105 estuvo entre $1,1 \times 10^{-9}$ y $1,3 \times 10^{-8}$ transconjugantes por donador (tabla 21). El límite de detección en los ensayos de conjugación entre los aislados de *E. faecalis* y *E. faecalis* JH2-2 fue ligeramente superior, ya que osciló entre $4,5 \times 10^{-9}$ y $2,8 \times 10^{-8}$ (tabla 21), aunque el mayor rango de transferencia se observó entre *E. hirae* CICYT-467 y *E. faecalis* JH2-2, con un límite de detección de $3,6 \times 10^{-6}$ transconjugantes por donador (tabla 21). No se observó transferencia del gen *tet*(M) desde los aislados de *E. coli* donadores a los enterococos receptores (tabla 21). Por el contrario, este gen fue transferido con éxito desde los cuatro aislados de enterococos empleados como donadores al aislado de *E. coli* receptor CICYT-70-Ri. En este caso, la transferencia del gen *tet*(M) desde los aislados de *E. faecalis* a *E. coli* osciló entre $3,1 \times 10^{-8}$ y $3,8 \times 10^{-8}$ transconjugantes por donador (tabla 21), siendo la transferencia del gen algo menor cuando *E. hirae* fue empleado como donador (límite de detección de $2,2 \times 10^{-8}$ tc/dn, tabla 21).

Los resultados obtenidos en los ensayos de conjugación demuestran que el gen *tet*(M) detectado en los aislados de *E. coli* y enterococos procedentes de los cerdos tratados con colistina se encuentra en un elemento genético móvil con capacidad de ser transferido, al menos *in vitro*, entre aislados de enterococos y desde aislados de enterococos a aislados de *E. coli*, pero no desde *E. coli* a aislados de enterococos. De esta forma, en nuestro estudio se obtuvieron transconjugantes en todos los ensayos realizados entre *E. faecalis* (donador) y *E. faecium* (receptor), aunque cuando se empleó a *E. faecalis* como receptor y como donador, no se obtuvieron transconjugantes en 1 de los cuatro ensayos. Sin embargo, y a pesar de este resultado, el rango de transferencia del gen *tet*(M) entre aislados de *E. faecalis* detectado en este trabajo es superior al descrito en otros estudios realizados previamente (Huys *et al.*, 2004; Hummel *et al.*, 2007). Al emplear como aislado donador a *E. hirae*, no se observó la transferencia del gen cuando la cepa receptora fue *E. faecium* BM4501. Por el contrario, el gen *tet*(M) fue transferido con éxito cuando la cepa receptora empleada fue *E. faecalis* JH2-2 y,

Tabla 21. Resultados de los ensayos de conjugación.

Cepas donadoras	Especie	Tn916/ Tn5397	Frecuencia de transferencia a <i>E. faecalis</i> JH2-2 (Tc/dn) ¹	Frecuencia de transferencia a <i>E. faecium</i> BM4105 (Tc/dn)	Frecuencia de transferencia a <i>E. coli</i> CYCIT-70-Ri (Tc/dn)
CICYT-381	<i>E. faecalis</i>	-/-	ND ² ($< 1 \times 10^{-9}$) ³	1.1×10^{-9}	3.1×10^{-8}
CICYT-436	<i>E. faecalis</i>	-/-	4.5×10^{-9}	7×10^{-9}	3.1×10^{-8}
CICYT-453	<i>E. faecalis</i>	-/-	2.8×10^{-8}	1.3×10^{-8}	3.8×10^{-8}
CICYT-467	<i>E. hirae</i>	-/-	3.6×10^{-6}	ND ($< 0.7 \times 10^{-9}$)	2.2×10^{-8}
CICYT-268	<i>E. coli</i>	-/-	ND ($< 1.1 \times 10^{-10}$)	ND ($< 1.7 \times 10^{-10}$)	
CICYT-320	<i>E. coli</i>	-/-	ND ($< 1.5 \times 10^{-10}$)	ND ($< 1.4 \times 10^{-10}$)	
CICYT-332	<i>E. coli</i>	-/-	ND ($< 1.3 \times 10^{-10}$)	ND ($< 1.5 \times 10^{-10}$)	
CICYT-348	<i>E. coli</i>	-/-	ND ($< 2.3 \times 10^{-10}$)	ND ($< 1.8 \times 10^{-10}$)	

1: (Tc/dn): Transconjugantes por donador. 2: ND: Transferencia no detectada. 3: el resultado entre paréntesis representa el límite de detección expresado en unidades de Tc/dn.

según nuestros datos, esta es la primera vez que se describe la transferencia horizontal del gen *tet*(M) entre *E. hirae* y *E. faecalis*. De hecho, Rizzotti *et al.* (2009) intentaron llevar a cabo la transferencia de este gen empleando cepas de *E. hirae* como donadoras y *E. faecalis* OG1RF como receptora y no obtuvieron transconjugante alguno en sus ensayos.

En resumen, los resultados de este estudio demuestran que *in vitro* se produce la transferencia del gen *tet(M)* entre enterococos y entre enterococos y *E. coli*, lo que nos lleva a suponer que esta transferencia también puede producirse *in vivo* en el medio intestinal. En el siguiente apartado se analiza la posibilidad de que el origen del gen *tet(M)* en las cepas de *E. coli* portadoras de este gen detectadas en nuestro estudio estuviera en los enterococos.

4.5.3. Resultados de la secuenciación y relación filogenética del gen *tet(M)* detectado en los aislados de *E. coli* y *Enterococcus spp.* procedentes de cerdos tratados con colistina.

El gen *tet(M)* detectado en los aislados de *E. coli* y de enterococos descritos en las tablas 19 y 20 se secuenció empleando la estrategia descrita en el apartado 3.8.1 del capítulo de Material y Métodos.

La parte superior del gen *tet(M)* (figura 1 de Material y Métodos) se amplificó y secuenció en todos los aislados de *E. coli* y de enterococos incluidos en el estudio. Sin embargo, la parte inferior del gen (figura 1 de Material y Métodos) no se pudo amplificar ni secuenciar en ningún aislado de *E. coli* y sólo se amplificó en 12 de los 36 aislados de enterococos (CICYT-131, CICYT-132, CICYT-133, CICYT-202, CICYT-205, CICYT-383, CICYT- 452, CICYT-533, CICYT-616, CICYT-617, CICYT-641 y CICYT-653) de los cuales 10 eran portadores o del gen *int* del Tn916 o del gen *tndX* del Tn5397 (tabla 20).

Las secuencias del gen *tet(M)* de 4 de los aislados de *E. coli* (CICYT-268, CICYT-320, CICYT-332 Y CICYT-348) y de 7 enterococos (CICYT-205, CICYT-381, CICYT-383, CICYT-436, CICYT-452, CICYT-453 y CICYT-467) obtenidas en este estudio y que comprendieron 1802 pares de bases de las 1920 pares de bases del gen *tet(M)* completo se compararon a través de un análisis filogenético que reveló la existencia de cinco tipos de secuencias diferentes divididas en cuatro grupos filogenéticos (figura 8).

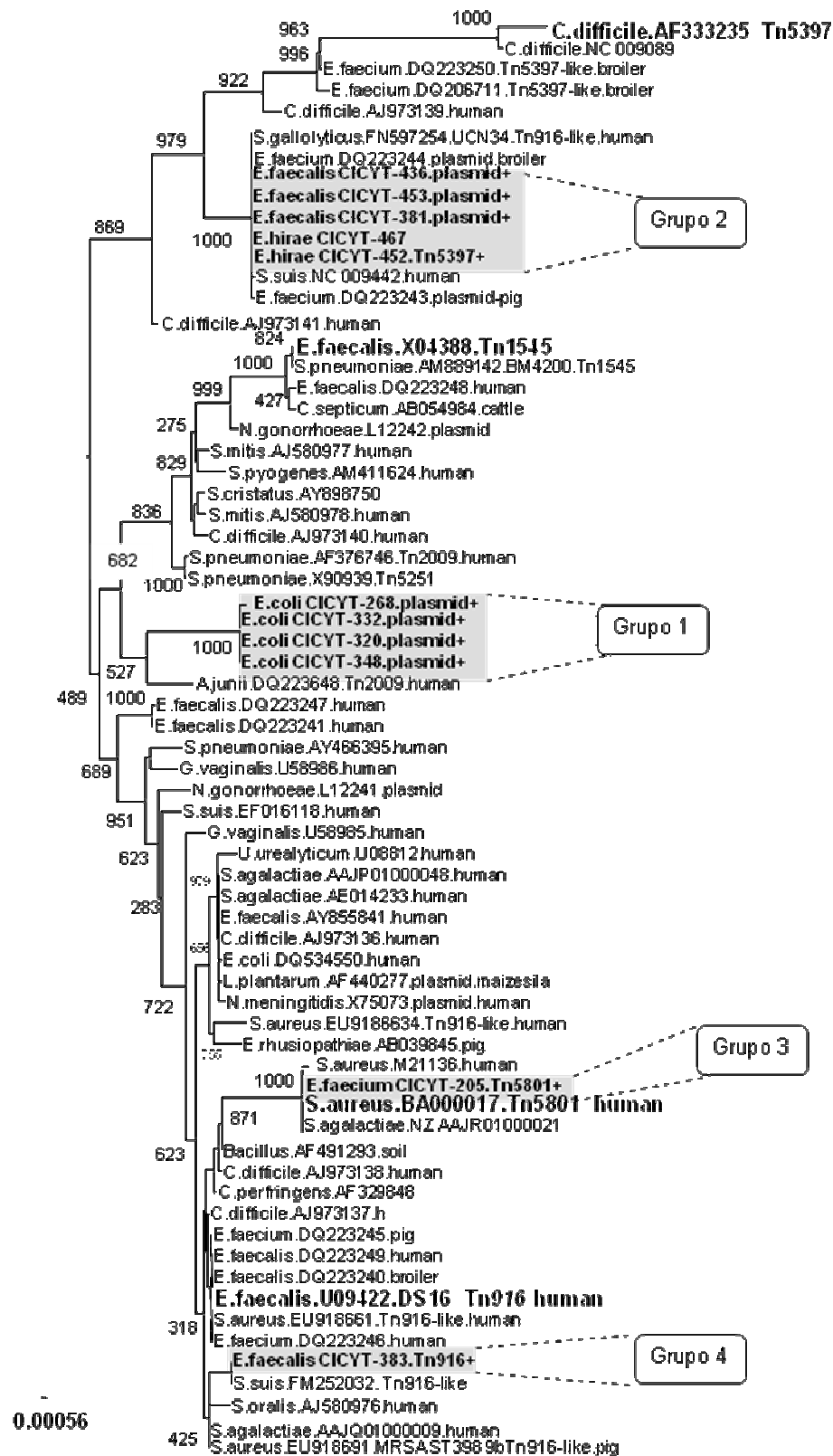


Figura 8. Árbol filogenético del gen *tet(M)*. La relación filogenética de los grupos se indica al comienzo de cada una de las ramas del árbol (relación expresada de 0 a 1000).

Según el árbol filogenético, las cuatro secuencias de los aislados de *E. coli* incluidos en el análisis, y en los que se presupuso una localización plasmídica del gen *tet(M)* al no detectarse en ellos transposones, forman un grupo diferenciado, lo que implica que representan un nuevo alelo del gen *tet(M)* no descrito previamente (figura 8).

En el análisis filogenético también se incluyeron las secuencias de cuatro enterococos en los que, asimismo, se presupuso la localización del gen *tet(M)* en un plásmido al no detectarse en ellos ninguno de los transposones analizados. Estas cuatro secuencias, así como la secuencia del aislado CICYT-452 portador del gen *tndX*-Tn5397 (grupo 2, figura 8), son idénticas entre sí y forman un grupo filogenético con un 100% de similitud con la secuencia del gen *tet(M)* descrita previamente en plásmidos, tanto de *E. faecium* de origen aviar (GeneBank número DQ223244) como de *E. faecium* de origen porcino (GeneBank DQ223243) y con el gen *tet(M)* localizado en el Tn916 en *Streptococcus gallolyticus* aislado de un ser humano (GeneBank número FN597254) (figura 8). Las secuencias del gen *tet(M)* detectado en los enterococos CICYT-383 y CICYT- 205 portadores de los genes *xis*-Tn916 y *int*-Tn5801 respectivamente, se agruparon con las secuencias del gen descritas previamente en estos transposones (figura 8, grupos 3 y 4).

Los resultados de este estudio sugieren que el gen *tet(M)* detectado en los aislados de *E. coli* procedentes de los cerdos tratados con colistina podría tener una localización plasmídica y demuestran que su secuencia está escasamente relacionada con las secuencias de este gen descritas hasta ahora, incluidas las de diferentes especies de enterococos. En consecuencia, podemos concluir que no parece probable que la presencia del gen *tet(M)* en los aislados de *E. coli* se deba a una transferencia de material genético procedente de los enterococos presentes en el medio intestinal durante el experimento, al menos de los analizados en el estudio. El origen del nuevo alelo del gen *tet(M)* detectado en los aislados de *E. coli* en este estudio merece una investigación más detallada.

5-CONCLUSIONES

PRIMERA

El modelo experimental empleado en el presente estudio no permitió evaluar claramente si la dosis de colistina administrada influyó o no en el desarrollo o selección de aislados de *Escherichia coli* resistentes a algunos de los antimicrobianos incluidos en este trabajo (amoxicilina y doxiciclina), y ello debido al elevado número de aislados resistentes detectados frente a estos antimicrobianos antes de iniciar el tratamiento con colistina por vía oral.

SEGUNDA

La administración por vía oral de colistina en cerdos, independientemente de la dosis administrada, no parece favorecer el desarrollo de aislados de *E. coli* resistentes a este antimicrobiano, aunque sí produce un incremento en el número de aislados de sensibilidad intermedia.

TERCERA

El tratamiento por vía oral con colistina en cerdos favoreció el desarrollo y/o selección de aislados de *E. coli* resistentes a gentamicina, independientemente de las dosis de colistina administrada.

CUARTA

La frecuencia de detección de aislados de *E. coli* portadores de los genes *tet(A)* y/o *tet(B)* antes de iniciar el tratamiento con colistina en cerdos revela el papel que esta bacteria puede jugar como reservorio de genes de resistencia a tetraciclinas. Así mismo, dada la frecuencia de detección del gen *tet(M)* en los aislados de nuestro estudio, este gen debe considerarse como posible determinante de resistencia a tetraciclinas en *E. coli*.

QUINTA

La elevada frecuencia de detección del gen *bla_{TEM}* en los aislados de *E. coli* antes de iniciar el tratamiento con colistina pone de manifiesto que esta bacteria supone un reservorio potencial de este tipo de genes de betalactamasas.

SEXTA

El tratamiento con colistina originó un cambio en las poblaciones de *E. coli* predominantes en la microbiota del íleon de los cerdos, favoreciendo el desarrollo de una población más homogénea desde el punto de vista genotípico y que presentó el fenotipo de resistencia mayoritario Dox^r-Amox^r-Gen^r.

SÉPTIMA

El gen *tet(M)* detectado en los aislados de *E. coli* de este estudio no estaba asociado con los transposones Tn916, Tn5397 o Tn5801, lo que podría indicar una localización plasmídica de este gen. Además, su secuencia está escasamente relacionada con las secuencias de este gen descritas hasta ahora, incluidas las de diferentes especies de enterococos, lo que indica que la presencia del gen *tet(M)* en los aislados de *E. coli* de este trabajo no se debió a la transferencia del mismo desde los enterococos presentes en el medio intestinal de los cerdos tratados con colistina por vía oral.

6-BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M. yJensen, L.B., 2000, Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis* 37, 127-137.
- Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Emborg, H.D., Pedersen, K., Hendriksen, R.S. yBager, F., 2001, Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2054-2059.
- Aarestrup, F.M. yWegener, H.C., 1999, The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes Infect* 1, 639-644.
- Abraham, E.P. yChain, E., 1988, An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* 10, 677-678.
- Agerso, Y., Pedersen, A.G. yAarestrup, F.M., 2006, Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* in enterococci from humans, pigs and poultry. *J Antimicrob Chemother* 57, 832-839.
- Alekshun, M.N. yLevy, S.B., 2007, Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128, 1037-1050.
- Ambler, R.P., 1980, The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289, 321-331.
- Anderson, A.D., Nelson, J.M., Rossiter, S. yAngulo, F.J., 2003, Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microb Drug Resist* 9, 373-379.
- Angulo, F.J., Nargund, V.N. yChiller, T.C., 2004, Evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51, 374-379.
- Arnold, T.M., Forrest, G.N. yMessmer, K.J., 2007, Polymyxin antibiotics for gram-negative infections. *Am J Health Syst Pharm* 64, 819-826.
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S. yCasellas, J.M., 1996, Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 509-513.
- Bertram, J., Stratz, M. yDurre, P., 1991, Natural transfer of conjugative transposon Tn916 between gram-positive and gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 173, 443-448.
- Bibbal, D., Dupouy, V., Prere, M.F., Toutain, P.L. yBousquet-Melou, A., 2009, Relatedness of *Escherichia coli* strains with different susceptibility phenotypes isolated from swine feces during ampicillin treatment. *Appl Environ Microbiol* 75, 2999-3006.
- Blake, D.P., Humphry, R.W., Scott, K.P., Hillman, K., Fenlon, D.R. yLow, J.C., 2003, Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations. *J Appl Microbiol* 94, 1087-1097.
- Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C.L., Reid-Smith, R., Janecko, N., Lim, H., Nicholson, V., McEwen, S.A., Friendship, R. yArchambault, M., 2005, Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl Environ Microbiol* 71, 6753-6761.

- Boyen, F., Vangroenweghe, F., Butaye, P., De Graef, E., Castryck, F., Heylen, P., Vanrobaeys, M. y Haesebrouck, F., 2010, Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Vet Microbiol* 144, 359-362.
- Breazeale, S.D., Ribeiro, A.A., McClerren, A.L. y Raetz, C.R., 2005, A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose. *J Biol Chem* 280, 14154-14167.
- Briñas, L., Zarazaga, M., Saenz, Y., Ruiz-Larrea, F. y Torres, C., 2002, Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3156-3163.
- Bryan, A., Shapir, N. y Sadowsky, M.J., 2004, Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol* 70, 2503-2507.
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. y Guedon, G., 2002, Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* 46, 601-610.
- Bush, K., 1989a, Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother* 33, 264-270.
- Bush, K., 1989b, Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob Agents Chemother* 33, 271-276.
- Bush, K., Jacoby, G.A. y Medeiros, A.A., 1995, A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 1211-1233.
- Callesen, J., 2003, Effects of termination of AGP use on pig welfare and productivity. Páginas 43-46 en "Working papers for the WHO international review panels evaluation". Documento WHO/CDS/CPE/ZFK/2003.1a. World Health Organization, Ginebra, Suiza. .
- Cambray, G., Guerout, A.M. y Mazel, D., 2010, Integrins. *Annu Rev Genet* 44, 141-166.
- Caroff, N., Espaze, E., Berard, I., Richet, H. y Reynaud, A., 1999, Mutations in the ampC promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyminocephalosporins without extended spectrum beta-lactamase production. *FEMS Microbiol Lett* 173, 459-465.
- Caroff, N., Espaze, E., Gautreau, D., Richet, H. y Reynaud, A., 2000, Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing ampC. *J Antimicrob Chemother* 45, 783-788.
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P. y Phillips, I., 2003, The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother* 52, 159-161.
- Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Nofrarias, M., Manzanilla, E.G. y Gasa, J., 2007, Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. *Vet Microbiol* 124, 239-247.
- Cauwerts, K., Decostere, A., De Graef, E.M., Haesebrouck, F. y Pasmans, F., 2007, High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the erm(B) gene. *Avian Pathol* 36, 395-399.
- Cavaco, L.M. y Aarestrup, F.M., 2009, Evaluation of quinolones for use in detection of determinants of acquired quinolone resistance, including the new transmissible resistance mechanisms qnrA, qnrB, qnrS, and aac(6')Ib-cr, in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and determinations of wild-type distributions. *J Clin Microbiol* 47, 2751-2758.

- Cavaco, L.M., Frimodt-Moller, N., Hasman, H., Guardabassi, L., Nielsen, L. y Aarestrup, F.M., 2008, Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microb Drug Resist* 14, 163-169.
- Cavaco, L.M., Hasman, H., Xia, S. y Aarestrup, F.M., 2009, qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 603-608.
- Cisterna, R., 1999, Resistencia bacteriana. En: *Antimicrobianos en medicina*. Sociedad Española de Quimioterapia. Editado por: García Sánchez, J.E., López, R. y Prieto, J. Prouss Science, Barcelona.
- Cleland, D., Krader, P. y Emerson, D., 2008, Use of the DiversiLab repetitive sequence-based PCR system for genotyping and identification of Archaea. *J Microbiol Methods* 73, 172-178.
- Clewell, D.B., 1990, Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9, 90-102.
- Clewell, D.B., Flannagan, S.E. y Jaworski, D.D., 1995, Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol* 3, 229-236.
- Colom, K., Perez, J., Alonso, R., Fernandez-Aranguiz, A., Larino, E. y Cisterna, R., 2003, Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, bla(SHV) and blaOXA-1 genes in Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett* 223, 147-151.
- Collignon, P. y Aarestrup, F.M., 2007, Extended-spectrum beta-lactamases, food, and cephalosporin use in food animals. *Clin Infect Dis* 44, 1391-1392.
- Curcio, M.J. y Derbyshire, K.M., 2003, The outs and ins of transposition: from mu to kangaroo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 865-877.
- Chopra, I. y Roberts, M., 2001, Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 232-260 ; second page, table of contents.
- De Leener, E., Martel, A., Decostere, A. y Haesebrouck, F., 2004, Distribution of the erm (B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microb Drug Resist* 10, 341-345.
- de Vries, L.E., Christensen, H., Skov, R.L., Aarestrup, F.M. y Agerso, Y., 2009, Diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 64, 490-500.
- Diarrassouba, F., Diarra, M.S., Bach, S., Delaquis, P., Pritchard, J., Topp, E. y Skura, B.J., 2007, Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. *J Food Prot* 70, 1316-1327.
- Dibner, J.J. y Richards, J.D., 2005, Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci* 84, 634-643.
- Doucet-Populaire, F., Trieu-Cuot, P., Dosbaa, I., Andremont, A. y Courvalin, P., 1991, Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 185-187.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J. y Zhao, X., 2008, Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 385-392.

- Emborg, H.D., Andersen, J.S., Seyfarth, A.M. yWegener, H.C., 2004, Relations between the consumption of antimicrobial growth promoters and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* isolated from broilers. *Epidemiol Infect* 132, 95-105.
- EMA, 1999, European Agency for the Evaluation of Medical Products. Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. . EMA/CVMP/342/99.
- EMA/CVMP/244/01-FINAL, Guideline on Pre-authorisation Studies to assess the Potential for Resistance Resulting from the Use of Antimicrobial Veterinary Medicinal Products
- Enne, V.I., Cassar, C., Sprigings, K., Woodward, M.J. yBennett, P.M., 2008, A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiol Lett* 278, 193-199.
- Enne, V.I., Livermore, D.M., Stephens, P. yHall, L.M., 2001, Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet* 357, 1325-1328.
- Everett, M.J., Jin, Y.F., Ricci, V. yPiddock, L.J., 1996, Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 2380-2386.
- Falagas, M.E. yKasiakou, S.K., 2005, Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 40, 1333-1341.
- Falagas, M.E., Rafailidis, P.I. yMatthaiou, D.K., 2010, Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat*.
- Falagas, M.E., Rzos, M., Bliziotis, I.A., Rellos, K., Kasiakou, S.K. yMichalopoulos, A., 2005, Toxicity after prolonged (more than four weeks) administration of intravenous colistin. *BMC Infect Dis* 5, 1.
- Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M.P., Latorre, A., Drainas, C. yde la Cruz, F., 2004, A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* 28, 79-100.
- Frasson, I., Cavallaro, A., Bergo, C., Richter, S.N. yPalu, G., Prevalence of *aac(6')-Ib-cr* plasmid-mediated and chromosome-encoded fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* in Italy. *Gut Pathog* 3, 12.
- García de Lomas, J., Navarro, D. yGimeno, C. 1999. Mecanismo de acción de los antimicrobianos. In *Antimicrobianos en Medicina*, García Sánchez, J.E., López, R., Prieto, J., eds. (Sociedad Española de Quimioterapia, Prous Science.).
- García, J.E., Fresnadillo, M. J., Arce, J. J. y García, E., 1999, Antibióticos betalactámicos. En: *Antimicrobianos en medicina*. Sociedad Española de Quimioterapia. Editado por: García Sánchez, J.E., López, R. y Prieto, J. Prouss Science, Barcelona.
- Gobernado, M., 2003, Reflexiones sobre resistencia bacteriana. *Rev Esp Quimioter* 16, 158-160.
- Goncalves, A., Torres, C., Silva, N., Carneiro, C., Radhouani, H., Coelho, C., Araujo, C., Rodrigues, J., Vinue, L., Somalo, S., Poeta, P. ylgrejas, G., 2010, Genetic characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates of pigs from a Portuguese intensive swine farm. *Foodborne Pathog Dis* 7, 1569-1573.
- Gould, I.M. yMacKenzie, F.M., 2002, Antibiotic exposure as a risk factor for emergence of resistance: the influence of concentration. *J Appl Microbiol* 92 Suppl, 78S-84S.
- Guardabassi, L. yCourvalin, P., 2006, Modes of Antimicrobial Action and Mechanisms of Bacterial Resistance. En: *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Editado por: F. M. Aarestrup. ASM Press.

- Hammerum, A.M., Jensen, L.B. yAarestrup, F.M., 1998, Detection of the *satA* gene and transferability of virginiamycin resistance in *Enterococcus faecium* from food-animals. *FEMS Microbiol Lett* 168, 145-151.
- Heisig, P., 1996, Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 879-885.
- Hentschke, M., Kotsakis, S.D., Wolters, M., Heisig, P., Miriagou, V. yAepfelbacher, M., CMY-42, a novel plasmid-mediated CMY-2 variant AmpC beta-lactamase. *Microb Drug Resist* 17, 165-169.
- Hinerfeld, D. yChurchward, G., 2001, Specific binding of integrase to the origin of transfer (*oriT*) of the conjugative transposon Tn916. *J Bacteriol* 183, 2947-2951.
- Hooper, D.C., 1999, Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat* 2, 38-55.
- Hooper, D.C., 2001, Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 32 Suppl 1, S9-S15.
- Hopkins, K.L., Davies, R.H. yThrelfall, E.J., 2005, Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 25, 358-373.
- Hummel, A., Holzapfel, W.H. yFranz, C.M., 2007, Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst Appl Microbiol* 30, 1-7.
- Huys, G., D'Haene, K., Collard, J.M. ySwings, J., 2004, Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl Environ Microbiol* 70, 1555-1562.
- Jacoby, G.A., 2009, AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22, 161-182, Table of Contents.
- Jacoby, G.A., Walsh, K.E., Mills, D.M., Walker, V.J., Oh, H., Robicsek, A. yHooper, D.C., 2006, *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1178-1182.
- Jiang, H.X., Lu, D.H., Chen, Z.L., Wang, X.M., Chen, J.R., Liu, Y.H., Liao, X.P., Liu, J.H. yZeng, Z.L., 2009, High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China. *Vet J*.
- Jones, C.S., Osborne, D.J. yStanley, J., 1992, Enterobacterial tetracycline resistance in relation to plasmid incompatibility. *Mol Cell Probes* 6, 313-317.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. yMoble, H.L., 2004, Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123-140.
- Kaye, K.S., Gold, H.S., Schwaber, M.J., Venkataraman, L., Qi, Y., De Girolami, P.C., Samore, M.H., Anderson, G., Rasheed, J.K. yTenover, F.C., 2004, Variety of beta-lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli* isolated in the northeastern United States. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1520-1525.
- Kijima-Tanaka, M., Ishihara, K., Morioka, A., Kojima, A., Ohzono, T., Ogikubo, K., Takahashi, T. yTamura, Y., 2003, A national surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Japan. *J Antimicrob Chemother* 51, 447-451.
- Kim, H.B., Park, C.H., Kim, C.J., Kim, E.C., Jacoby, G.A. yHooper, D.C., 2009, Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 639-645.
- Konstantinov, S.R., Favier, C.F., Zhu, W.Y., Williams, B.A., Kluss, J., Souffrant, W.B., de Vos, W.M., Akkermans, A.D.L. ySmidt, H., 2004, Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Animal Research* 53, 317-324.
- Kowalski, R.P., Dhaliwal, D.K., Karenchak, L.M., Romanowski, E.G., Mah, F.S., Ritterband, D.C. yGordon, Y.J., 2003, Gatifloxacin and moxifloxacin: an in vitro susceptibility

- comparison to levofloxacin, ciprofloxacin, and ofloxacin using bacterial keratitis isolates. *Am J Ophthalmol* 136, 500-505.
- Kumai, Y., Suzuki, Y., Tanaka, Y., Shima, K., Bhadra, R.K., Yamasaki, S., Kuroda, K. yEndo, G., 2005, Characterization of multidrug-resistance phenotypes and genotypes of *Escherichia coli* strains isolated from swine from an abattoir in Osaka, Japan. *Epidemiol Infect* 133, 59-70.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. yHiramatsu, K., 2001, Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, 1225-1240.
- Lalles, J.P., Bosi, P., Smidt, H. yStokes, C.R., 2007, Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc Nutr Soc* 66, 260-268.
- Landman, D., Georgescu, C., Martin, D.A. yQuale, J., 2008, Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev* 21, 449-465.
- Lanz, R., Kuhnert, P. yBoerlin, P., 2003, Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol* 91, 73-84.
- Lee, Y.J., Cho, J.K., Kim, K.S., Tak, R.B., Kim, A.R., Kim, J.W., Im, S.K. yKim, B.H., 2005, Fluoroquinolone resistance and *gyrA* and *parC* mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. *J Microbiol* 43, 391-397.
- Lees, P. yShojaee AliAbadi, F. 2002. Antimicrobianos que inhiben la función de los ácidos nucleicos. In *Farmacología y Terapéutica Veterinaria.*, Botana, L.M., Landoni, F., Martín-Jiménez, T., eds. (McGraw-Hill).
- Lees, P. yShojaee AliAbadi, F. 2003. Antimicrobianos que inhiben la función de los ácidos nucleicos. En: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria.* L.M. Botana, F. Landoni y T. Martín-Jiménez. McGraw-Hill.
- Lemos, L.M., 2003, Antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas. En: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria.* L.M. Botana, F. Landoni y T. Martín-Jiménez. McGraw-Hill. .
- Li, J., Nation, R.L., Milne, R.W., Turnidge, J.D. yCoulthard, K., 2005, Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 25, 11-25.
- Lim, S.K., Lee, H.S., Nam, H.M., Cho, Y.S., Kim, J.M., Song, S.W., Park, Y.H. yJung, S.C., 2007, Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003-2004. *Int J Food Microbiol* 116, 283-286.
- Llarrull, L.I., Testero, S.A., Fisher, J.F. yMobashery, S., 2010, The future of the beta-lactams. *Curr Opin Microbiol* 13, 551-557.
- Macrogen, Korea, http://www.macrogen.com/eng/sequencing/sequence_main.jsp.
- Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., Martinez-Martinez, L. yNordmann, P., 2005, Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 71-76.
- Manges, A.R., Smith, S.P., Lau, B.J., Nuval, C.J., Eisenberg, J.N., Dietrich, P.S. yRiley, L.W., 2007, Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a case-control study. *Foodborne Pathog Dis* 4, 419-431.

- Marin, M. y Gudiol, F., 2003, [beta-Lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21, 42-55.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A. y Jacoby, G.A., 1998, Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351, 797-799.
- Martinez, M., McDermott, P. y Walker, R., 2006, Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet J* 172, 10-28.
- Mascaretti, O.A. 2003a. Antibiotics That Affect Membrane Permeability: Cyclic Peptides. En: *Bacteria versus Antibacterial Agents: an Integrated Approach*. ASM Press..
- Mascaretti, O.A., 2003b, Beta-lactams, Penicillin-Binding Proteins and Beta-Lactamases. En: *Bacteria versus Antibacterial Agents. An Integrated Approach*. ASM Press.
- Mascaretti, O.A. 2003c. Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV: Quinolones. En: *Bacteria Versus Antibacterial Agents.:An Integrated Approach*. ASM Press..
- Mascaretti, O.A., 2003d, Inhibitors of the 30S Ribosomal Subunit. Aminoglycosides and Tetracyclines. En: *Bacteria versus Antibacterial Agents. An Integrated Approach*. ASM Press.
- Mascaretti, O.A., 2003e, Molecular Genetics of Bacteria. En: *Bacteria versus Antibacterial Agents. An Integrated Approach*. ASM Press.
- Mateu, E. y Martin, M., 2000, Antimicrobial resistance in enteric porcine *Escherichia coli* strains in Spain. *Vet Rec* 146, 703-705.
- Maynard, C., Fairbrother, J.M., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Lariviere, S. y Harel, J., 2003, Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3214-3221.
- McDermott, P.F., Walker, R.D. y White, D.G., 2003, Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol* 22, 135-143.
- McDermott, P.F., Zhao, S., Wagner, D.D., Simjee, S., Walker, R.D. y White, D.G., 2002, The food safety perspective of antibiotic resistance. *Anim Biotechnol* 13, 71-84.
- Medina, A., Horcajo, P., Jurado, S., De la Fuente, R., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Dominguez-Bernal, G. y Orden, J.A., 2011, Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* strains from ruminants. *J Vet Diagn Invest* 23, 91-95.
- Molbak, K., 2004, Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans--the public health consequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51, 364-369.
- Moreno, M.A., Dominguez, L., Teshager, T., Herrero, I.A. y Porrero, M.C., 2000, Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. The VAV Network. Red de Vigilancia de Resistencias Antibioticas en Bacterias de Origen Veterinario. *Int J Antimicrob Agents* 14, 285-290.
- Ng, L.K., Martin, I., Alfa, M. y Mulvey, M., 2001, Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes* 15, 209-215.
- Nordmann, P. y Poirel, L., 2002, Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8, 321-331.
- Normark, B.H. y Normark, S., 2002, Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* 252, 91-106.
- Ochman, H., Lawrence, J.G. y Groisman, E.A., 2000, Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299-304.
- Oppegaard, H., Steinum, T.M. y Wasteson, Y., 2001, Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. *Appl Environ Microbiol* 67, 3732-3734.

- Over, U., Gur, D., Unal, S. y Miller, G.H., 2001, The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 7, 470-478.
- Piddock, L.J., 1996, Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? *J Antimicrob Chemother* 38, 1-3.
- Ploy, M.C., Lambert, T., Couty, J.P. y Denis, F., 2000, Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin Chem Lab Med* 38, 483-487.
- Poyart, C., Celli, J. y Trieu-Cuot, P., 1995, Conjugative transposition of Tn916-related elements from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 500-506.
- Prescott, J.F., 2006, History of Antimicrobial Usage in Agriculture: an Overview. En *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Editado por: F.M. Aarestrup, ASM Press.
- Quiles, A.a.H., M., 2006, Características de la flora intestinal del lechón: efecto de los probióticos. *Producción Animal*. 219, 4-19.
- Rahaman, S.O., Mukherjee, J., Chakrabarti, A. y Pal, S., 1998, Decreased membrane permeability in a polymyxin B-resistant *Escherichia coli* mutant exhibiting multiple resistance to beta-lactams as well as aminoglycosides. *FEMS Microbiol Lett* 161, 249-254.
- Rice, L.B., Bonomo, R. A., 2007, Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 9th edition, Vol. 1. ASM Press.
- Rizzotti, L., La Gioia, F., Dellaglio, F. y Torriani, S., 2009, Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene tet(M), carried on Tn916-1545 family transposons, in enterococci from a total food chain. *Antonie Van Leeuwenhoek*.
- Roberts, A.P., Chandler, M., Courvalin, P., Guedon, G., Mullany, P., Pembroke, T., Rood, J.I., Smith, C.J., Summers, A.O., Tsuda, M. y Berg, D.E., 2008, Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* 60, 167-173.
- Roberts, A.P., Johanesen, P.A., Lyras, D., Mullany, P. y Rood, J.I., 2001, Comparison of Tn5397 from *Clostridium difficile*, Tn916 from *Enterococcus faecalis* and the CW459tet(M) element from *Clostridium perfringens* shows that they have similar conjugation regions but different insertion and excision modules. *Microbiology* 147, 1243-1251.
- Roberts, A.P. y Mullany, P., 2011, Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35, 856-871.
- Roberts, M.C., 2005, Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 245, 195-203.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H., Bush, K. y Hooper, D.C., 2006a, Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12, 83-88.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahm, D.F., Jacoby, G.A. y Hooper, D.C., 2006b, qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2872-2874.
- Saenz, Y., Brinas, L., Dominguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J. y Torres, C., 2004, Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3996-4001.
- Saenz, Y., Zarazaga, M., Brinas, L., Ruiz-Larrea, F. y Torres, C., 2003, Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 51, 1001-1005.

- Salyers, A.A., Gupta, A. yWang, Y., 2004, Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* 12, 412-416.
- Sandvang, D. yAarestrup, F.M., 2000, Characterization of aminoglycoside resistance genes and class 1 integrons in porcine and bovine gentamicin-resistant *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist* 6, 19-27.
- Scott, K.P., 2002, The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci* 59, 2071-2082.
- Schierack, P., Kadlec, K., Guenther, S., Filter, M., Schwarz, S., Ewers, C. yWieler, L.H., 2009, Antimicrobial resistances do not affect colonization parameters of intestinal *E. coli* in a small piglet group. *Gut Pathog* 1, 18.
- Schwaiger, K., Holzel, C. yBauer, J., 2010, Resistance gene patterns of tetracycline resistant *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Vet Microbiol* 142, 329-336.
- Schwarz, S., Cloeckert, A., Roberts, M. C., 2006, Mechanisms and Spread of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. En: *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Editado por: F. M. Aarestrup. ASM Press.
- Schwarz, S. yChaslus-Dancla, E., 2001, Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res* 32, 201-225.
- Sengelov, G., Halling-Sorensen, B. yAarestrup, F.M., 2003, Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E. coli* from food animals. *Vet Microbiol* 95, 91-101.
- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S. yMiller, G.H., 1993, Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57, 138-163.
- Shryock, T.R. yRichwine, A., 2010, The interface between veterinary and human antibiotic use. *Ann N Y Acad Sci* 1213, 92-105.
- Silley, P., Stephan, B., Greife, H.A. yPridmore, A., 2007, Comparative activity of pradofloxacin against anaerobic bacteria isolated from dogs and cats. *J Antimicrob Chemother* 60, 999-1003.
- Smith, D.L., Harris, A.D., Johnson, J.A., Silbergeld, E.K. yMorris, J.G., Jr., 2002, Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6434-6439.
- Sorum, H. ySunde, M., 2001, Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet Res* 32, 227-241.
- Speer, B.S., Bedzyk, L. ySalysers, A.A., 1991, Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. *J Bacteriol* 173, 176-183.
- Stannarius, C., Burgi, E., Regula, G., Zychowska, M.A., Zweifel, C. yStephan, R., 2009, Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from Swiss weaned pigs and sows. *Schweiz Arch Tierheilkd* 151, 119-125.
- Stein, A. yRaoult, D., 2002, Colistin: an antimicrobial for the 21st century? *Clin Infect Dis* 35, 901-902.
- Stein, H.H., 2002, Experience of feeding pigs without antibiotics: a European perspective. *Anim Biotechnol* 13, 85-95.
- Storm, D.R., Rosenthal, K.S. ySwanson, P.E., 1977, Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem* 46, 723-763.

- Sufya, N., Allison, D.G. yGilbert, P., 2003, Clonal variation in maximum specific growth rate and susceptibility towards antimicrobials. *J Appl Microbiol* 95, 1261-1267.
- Sunde, M., Fossum, K., Solberg, A. ySorum, H., 1998, Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb Drug Resist* 4, 289-299.
- Swann, M.M., Baxter, K.L., Field, H.I., 1969, Report of the Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. HMSO.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. yKumar, S., 2007, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Tannock, G.W. ySavage, D.C., 1974, Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun* 9, 591-598.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. yHiggins, D.G., 1997, The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882.
- Torrallardona, D., Conde, M.R., Badiola, I., Polo, J. yBrufau, J., 2003, Effect of fishmeal replacement with spray-dried animal plasma and colistin on intestinal structure, intestinal microbiology, and performance of weanling pigs challenged with *Escherichia coli* K99. *J Anim Sci* 81, 1220-1226.
- Torres, C. yZarazaga, M., 2002, [Antibiotics as growth promoters in animals. Are we going down the right road?]. *Gac Sanit* 16, 109-112.
- Tran, A.X., Lester, M.E., Stead, C.M., Raetz, C.R., Maskell, D.J., McGrath, S.C., Cotter, R.J. yTrent, M.S., 2005a, Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A. *J Biol Chem* 280, 28186-28194.
- Tran, J.H., Jacoby, G.A. yHooper, D.C., 2005b, Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 118-125.
- Tran, J.H., Jacoby, G.A. yHooper, D.C., 2005c, Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3050-3052.
- Trent, M.S., Ribeiro, A.A., Lin, S., Cotter, R.J. yRaetz, C.R., 2001, An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J Biol Chem* 276, 43122-43131.
- Valenzuela, M.S., Siddiqui, K.A. ySarkar, B.L., 1996, High expression of plasmid-encoded tetracycline resistance gene in *E. coli* causes a decrease in membrane-bound ATPase activity. *Plasmid* 36, 19-25.
- van den Bogaard, A.E., London, N., Driessen, C. yStobberingh, E.E., 2001, Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother* 47, 763-771.
- van den Bogaard, A.E. yStobberingh, E.E., 2000, Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 14, 327-335.
- Vanhoof, R., Content, J., Van Bossuyt, E., Dewit, L. yHannecart-Pokorni, E., 1992, Identification of the *aadB* gene coding for the aminoglycoside-2"-O-nucleotidyltransferase, ANT(2"), by means of the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 29, 365-374.
- Versalovic, J., Koeuth, T. yLupski, J.R., 1991, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19, 6823-6831.

- Verstegen, M.W. yWilliams, B.A., 2002, Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. *Anim Biotechnol* 13, 113-127.
- Vigil, K.J., Adachi, J.A., Aboufaycal, H., Hachem, R.Y., Reitzel, R.A., Jiang, Y., Tarrand, J.J., Chemaly, R.F., Bodey, G.P., Rolston, K.V. yRaad, I., 2009, Multidrug-resistant *Escherichia coli* bacteremia in cancer patients. *Am J Infect Control*.
- Vila, J., Ruiz, J., Goni, P. yDe Anta, M.T., 1996, Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 491-493.
- Witte, W., 1998, Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279, 996-997.
- Witte, W., 2000, Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int J Antimicrob Agents* 14, 321-325.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T. yArakawa, Y., 2007, New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3354-3360.
- Yan, S.S. yGilbert, J.M., 2004, Antimicrobial drug delivery in food animals and microbial food safety concerns: an overview of in vitro and in vivo factors potentially affecting the animal gut microflora. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1497-1521.
- Yang, H., Chen, S., White, D.G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R. yMeng, J., 2004, Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J Clin Microbiol* 42, 3483-3489.
- Yao, J.D.C.y.M., R. C., 2007, Antibacterial Agents. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition. ASM Press.